

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**Uso de células troncales mesenquimales derivadas de la grasa  
y plasma rico en plaquetas para el tratamiento preventivo de  
osteonecrosis de los maxilares relacionada con la toma de  
bisfosfonatos.**

**Estudio experimental en ratas**

Memoria que presenta para  
aspirar al grado de Doctor en Medicina:

Paula Barba Recreo

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Paula Barba Recreo".

Madrid, 23 de Junio de 2017

Junio 2017

Madrid, España

Don **Miguel Burgueño García**, Profesor asociado en el Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario La Paz; Don **Mariano García Arranz**, Profesor Asociado de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe del Laboratorio de Terapia Celular, en la Fundación Jiménez Díaz y Don **José Luis del Castillo Pardo de Vera**, Médico adjunto del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial en el Hospital Universitario La Paz

certifican

que Doña **Paula Barba Recreo** ha realizado bajo su dirección y tutela el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Cirugía titulado “**Uso células troncales mesenquimales derivadas de la grasa y plasma rico en plaquetas para el tratamiento preventivo de osteonecrosis de los maxilares relacionada con la toma de bisfosfonatos. Estudio experimental en ratas**”, cumpliendo todos los requisitos para ser presentado como Tesis Doctoral.

Una vez redactada la presente Memoria, ha sido revisada por los que suscriben, encontrándola apta para presentación ante el Tribunal que en su día se designe.



Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en  
Madrid, 23 de junio de 2017.

Dr Miguel Burgueño García

Dr. Mariano García Arranz

Dr José Luis del Castillo Pardo de Vera

Este trabajo forma parte del Proyecto de Investigación en Salud titulado: “Determinación de la relación causal entre el empleo de bisfosfonatos y el desarrollo de osteonecrosis en los maxilares. Aplicación de células madre mesenquimales para su tratamiento sobre modelo experimental animal” (Proyecto FIS Expediente nº PI10/01991). La autora de esta memoria ha participado en este proyecto como investigador colaborador.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Paco y Pili**, por su empuje y ánimo constante para culminar este largo viaje.

A mi hermana **Marta**, siempre inspiradora y alentadora como investigadora y como persona.

A mi marido **Tiho**, pilar fundamental de mi vida y de este trabajo. Gracias por tu tutela constante y tu apoyo incondicional.

A mis hijas, **Sofía y Gala**. No hay palabras para describir la fuerza que me dais.

A **Mariano**, por tu positividad y resolución. Siempre dispuesto a ayudar. Un amigo.

A **Miguel**, por su orientación y enseñanzas tanto en el campo de la cirugía maxilofacial como en la investigación. Gracias por haberme permitido formar parte de esta investigación.

A **Jose**, por su generosidad al brindarme este proyecto para poder desarrollarlo. Gracias por todos los conocimientos que me has regalado.

A **Luz**, por su infinita paciencia, su trabajo impecable y su amistad.

A **Carlota, Susana** y a todos los compañeros/as del animalario y del laboratorio, siempre colaboradores y dispuestos a echar una mano.

A todos aquellos cuyo trabajo me sirvió de inspiración.

## ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
<b>Lista de acrónimos .....</b>	<b>13</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>15</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>17</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>19</b>
I. Etiopatogenia de la osteonecrosis asociada a bisfosfonatos	
Bisfosfonatos .....	19
Osteonecrosis por bisfosfonatos .....	24
Definición .....	25
Estadios .....	26
Patogenia .....	30
Factores de riesgo para el desarrollo de BRONJ .....	35
II. Tratamiento de la osteonecrosis asociada a bisfosfonatos	
Prevención de BRONJ .....	41
Tratamiento de BRONJ establecido .....	45
III. Células troncales .....	50
IV. Plasma rico en plaquetas .....	58
V. Nuevas líneas de tratamiento de BRONJ .....	61
Proteínas morfogenéticas óseas .....	61
Oxígeno hiperbárico .....	61
Terapia con ozono médico .....	62
Terapia con láser a baja potencia .....	62
Teriparatida .....	63
Pentoxifilina y Tocoferol .....	63

<b>Hipótesis</b> .....	65
<b>Objetivos</b> .....	67
<b>Material y métodos</b> .....	69
I. Modelos de osteonecrosis por bisfosfonatos .....	69
II. Obtención de un modelo de osteonecrosis maxilar por ácido zoledrónico en rata .....	71
III. Estudio de tratamientos para la prevención del desarrollo de osteonecrosis maxilar por ácido zoledrónico en rata .....	77
<b>Resultados</b> .....	85
I. Obtención de un modelo de osteonecrosis maxilar por ácido zoledrónico en rata .....	85
II. Estudio de tratamientos para la prevención del desarrollo de osteonecrosis maxilar por ácido zoledrónico en rata .....	91
<b>Discusión</b> .....	99
<b>Conclusiones</b> .....	111
<b>Bibliografía</b> .....	113
<b>Lista de presentaciones en congresos y publicaciones derivadas de la tesis doctoral</b> .....	137
<b>Curriculum vitae resumido</b> .....	153

## RESUMEN

La osteonecrosis de los maxilares relacionada con la toma de bisfosfonatos (BRONJ) es una patología de frecuencia creciente, asociada a estos fármacos antirresortivos de amplio uso. El principal reto en el manejo de BRONJ es la ausencia de un tratamiento efectivo establecido. El objetivo de este trabajo fue comparar diferentes tratamientos potencialmente preventivos, aplicados en un modelo animal de BRONJ. Con este fin, se realizó inicialmente la puesta a punto un modelo de BRONJ en rata con administración de ácido zoledrónico (ZA), como único fármaco implicado en el desarrollo de osteonecrosis, y extracciones dentales, como importante factor desencadenante de esta patología. Sobre este modelo de BRONJ en rata, estudiamos la aplicación local de diferentes combinaciones de células troncales derivadas de la grasa (ASCs) con o sin estimulación previa con proteína morfogenética 2 (BMP2) y plasma rico en plaquetas (PRP).

Cincuenta y seis ratas Wistar fueron tratadas con ZA durante 9 semanas, se realizaron extracciones dentales en la octava semana y los animales fueron divididos en cuatro grupos. En el grupo 1 (n=14), se realizó una cobertura del alveolo postextracción con un colgajo mucoperióstico. En el grupo 2 (n=14), se aplicó PRP sobre los alveolos y se realizó su cobertura con un colgajo mucoperióstico. En el grupo 3 (n=15), se aplicaron ASCs alogénicas con PRP sobre los alveolos, y se realizó su cobertura con el colgajo. En el grupo 4 (n=13), los animales fueron tratados con ASCs cultivadas con BMP2, PRP y cobertura con colgajo mucoperióstico. Se realizaron estudios histológicos, de fluorescencia y radiológicos de los maxilares.

Los animales tratados con ASCs mostraron una frecuencia de osteonecrosis inferior (14% vs 50%  $p=0.007$ ), un remodelamiento óseo ( $p=0.024$ ) y un conteo de osteoclastos ( $p=0.024$ ) mayor que aquellos no tratados con ASCs.

Sobre nuestro modelo de BRONJ, los tratamientos basados en ASCs parecen prevenir el desarrollo de osteonecrosis de manera más efectiva que la cobertura con colgajo mucoso con o sin PRP. La combinación del ASCs y PRP parece ser sinérgica y la adición de BMP-2 podría mejorar los resultados, aunque no hemos obtenido resultados que lo avalen en el presente estudio.

## LISTA DE ACRÓNIMOS

ASCs - Adipose-derived stem cells (Células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo)

BF - Bisfosfonatos

BM-MSCs - Bone marrow mesenchymal stem cells (Células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea)

BMP - Bone morphogenetic protein (Proteína morfogenética)

BRONJ - Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (Osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos)

bFGF – Basic fibroblast growth factor (Factor de crecimiento fibroblástico básico)

HGF - Hepatocyte growth factor (Factor de crecimiento de hepatocitos)

IL - Interleukina (Interleucina)

MSCs - Mesenchymal stem cells (Células troncales mesenquimales)

MMP - Matrix metalloproteinase (Metaloproteinasa de matriz)

MRONJ - Medication-related osteonecrosis of the jaw (Osteonecrosis de los maxilares por medicamentos)

NK - Natural Killer cells

PRP - Platelet rich plasma (Plasma rico en plaquetas)

VEGF - Vascular endothelial growth factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)

ZA - Zoledronic acid (Ácido zoledrónico)

TNF - Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Plasma rico en plaquetas.

Figura 2. Exodoncia molares maxilar derecho.

Figura 3. Sección sagital del hueso alveolar.

Figura 4. Aplicación de ASCs en el estudio de tratamiento preventivos para el desarrollo de BRONJ.

Figura 5. Imágenes histológicas de los alveolos post extracción. Alta magnificación. Estudio para la obtención de un modelo animal de BRONJ.

Figura 6. Imágenes histológicas de los alveolos post-extracción. Baja magnificación. Estudio para la obtención de un modelo animal de BRONJ.

Figura 7. Hallazgos radiográficos. Estudio para la obtención de un modelo animal de BRONJ.

Figura 8. Imágenes histológicas de los alveolos post-extracción. Estudio tratamientos de prevención de BRONJ.

Figura 9. Estudio de fluorescencia. Estudio tratamientos de prevención de BRONJ.

Figura 10. Hallazgos radiográficos. Estudio tratamientos de prevención de BRONJ.

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Comparación entre los distintos tipos de bisfosfonatos

Tabla 2. Resumen de los principales modelos murinos experimentales utilizados en estudios de inducción de BRONJ

Tabla 3. Distribución animal por grupos en el estudio para la obtención de un modelo animal de BRONJ.

Tabla 4. Hallazgos histológicos en el estudio para la obtención de un modelo animal de BRONJ.

Tabla 5. Hallazgos radiográficos en el estudio para la obtención de un modelo animal de BRONJ.

Tabla 6: Resultados histológicos en cada uno de grupo de tratamiento en el estudio de tratamientos preventivos de BRONJ.

Tabla 7: Hallazgos histológicos tras el reagrupamiento en grupos con y sin tratamiento con ASCs, en el estudio de tratamientos preventivos de BRONJ.

Tabla 8: Hallazgos radiográficos de cada grupo de tratamiento en el estudio de tratamientos preventivos de BRONJ.

## INTRODUCCIÓN

### I. Etiopatogenia de la osteonecrosis asociada a bisfosfonatos

#### **Bisfosfonatos**

Los bisfosfonatos (BF) son fármacos con una extensa aplicación en la medicina, utilizados en el tratamiento de patologías con destrucción ósea asociada. Son los fármacos antirreabsortivos óseos más efectivos en el tratamiento de enfermedades con actividad osteoclástica elevada como la osteoporosis postmenopáusica(1), enfermedad de Paget, hipercalcemia maligna, hiperparatiroidismo primario y secundario, así como las osteolisis asociadas a tumores, por lo que se han convertido en el tratamiento de elección.


Los BFs constituyen un grupo de agentes farmacológicos sintetizados por primera vez en 1969, pero sus acciones bioquímicas no fueron elucidadas hasta los años 90(2). Los BFs inhiben la reabsorción ósea mediante la captación selectiva y la adsorción a la superficie mineral en hueso, donde son internalizados por los osteoclastos, interfiriendo en la reabsorción mediada por estas células. Desde entonces, los BFs se desarrollaron para el tratamiento de enfermedades óseas y alteraciones del metabolismo del calcio.

Los BFs son análogos químicos de los pirofosfatos inorgánicos. Su origen estuvo en los pirofosfatos (cadena central P-O-P), los cuales tienen la propiedad de disolver el carbonato cálcico, gran afinidad por el pirofosfato cálcico y en consecuencia, por el hueso. Estas sustancias pueden acumularse

en el hueso gracias a su unión irreversible con el cristal de hidroxapatita.

Tienen efectos físicos y químicos similares al pirofosfato, pero son resistentes a la hidrólisis enzimática y al calor. Esto es debido a la unión P-C-P de los bisfosfonatos, que a diferencia de la P-O-P de los pirofosfatos, es estable, de forma que no se altera su actividad. Tienen también alta afinidad por iones metálicos, como el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sustituciones posteriores permitieron la síntesis de fármacos biológicamente activos, cada uno de ellos con actividad y efectos óseos característicos (Tabla 1) (3).

Bisfosfoato	Nombre comercial	R1	R2	Potencia relativa <sup>1</sup>	Indicación habitual
Etidronato	Didronel® Difosfen® Osteum®	-OH	-CH <sub>2</sub>	1 x	Enfermedad de Paget
Clodronato	Ostac® Bonefos®	-CL	-CL	10 x	Metástasis óseas
Pamidronato	Aredia® Linoten® Pamifos®	-OH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	100 x	Metástasis óseas Mieloma múltiple
Alendronato	Fosamax® Adronat® Fosavance®	-OH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	1.000 x	Osteoporosis
Risendronato	Actonel® Acrel® Losentra®	-OH	-CH <sub>2</sub> - 	5.000 x	Osteoporosis
Ibandronato	Bonviva® Boniva® Bondronat®	-OH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	10.000 x	Osteoporosis


Zoledronato	Zometa®	-OH	$-\text{CH}_2-\text{N}$ 	100.000 x	Metástasis óseas Mieloma múltiple
	Aclasta® Reclast®				Osteoporosis

Tabla 1: Comparación entre los distintos tipos de bisfosfonatos.

R1 y R2: grupos covalentes unidos a la cadena de P-C-P.

<sup>1</sup>El Etidronato es el bisfosfonato considerado con potencia relativa 1.

BFs tienen propiedades comunes como baja absorción intestinal, elevada afinidad por el mineral óseo, efectos inhibitorios en la actividad osteoclástica, prolongada retención ósea y excreción urinaria. Son en general, bien tolerados, aunque se han descrito algunas reacciones adversas.

Los BFs se incorporan de manera preferente en las áreas con actividad remodelación osteoclástica. Su acción antirreabsortiva, reduce la remodelación ósea y acelera de forma secundaria la mineralización, originando un rápido incremento en la densidad ósea y el consecuente balance positivo del calcio.

Los BFs se clasifican principalmente en dos grupos, con diferentes mecanismos moleculares de acción :

- BFs que no contienen nitrógeno en sus cadenas laterales, como etidronato, y clodronato, originan la formación de metabolitos citotóxicos en los osteoclastos.

Generan un análogo de la adenosina trifosfato tóxico que inhibe de forma efectiva la principal función de la mitocondria, interfiere en las vías dependientes de ATP intracelulares, desencadenando una disminución en la

producción de energía en los osteoclastos.

- BFs que contienen nitrógeno, aminobisfosfonatos (pamidronato, alendronato, risendronato, ibandronato y zoledronato), tienen mayor potencia que sus predecesores, ya que actúan a nivel intracelular sobre la farnesil difosfato sintetasa, encima crítica en la vía del mevalonato. La inhibición de esta enzima impide la biosíntesis de compuestos isopreniodes como farsenol y geranilgeraniol, necesarios para la fenilación de proteínas de señal GPTasas, como rab, rho y rac, esenciales en la señalización intracelular de los osteoclastos y en consecuencia, se impide el correcto funcionamiento celular (4).

Los osteoclastos son las células diana de los BFs y su papel en remodelación ósea es conocido hace tiempo, siendo las únicas células con capacidad para reabsorber el hueso(5). Inician la remodelación ósea durante el crecimiento, la erupción dentaria y la cicatrización de fracturas. Median en la pérdida ósea en situaciones patológicas como osteoartritis y osteoporosis. La reabsorción ósea osteoclástica se continua con la angiogénesis en la matriz ósea, en la cual los osteoclastos también están implicados. Expresan factores angiogénicos como VEGF, Angiopoyetina 1 y 2 y MMP-9 en áreas de remodelación ósea (6). Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas del linaje mieloide y también tienen función como células inmunorreguladoras. Estas células y sus precursores participan en la resolución de la inflamación en y entorno al hueso. Son potentes activadores de células natural killer (NK), linfocitos T y  $\gamma\delta$  T, siendo este efecto más potente que el producido por monocitos y células dendríticas en la regulación de la secreción de citoquinas y quimoquinas producidas por células NK.

Se ha constatado que los BFs regulan la reabsorción osteoclástica mediante diferentes vías, incluyendo el reclutamiento de osteoclastos, su diferenciación y la apoptosis. Los osteoclastos tratados con BFs se caracterizan morfológicamente por la ausencia de un borde ondulado en la región de invaginación de la membrana plasmática orientada hacia la cavidad reabsortiva. Los BFs también parecen ocasionar interrupciones en el citoesqueleto de estas células multinucleadas. Se acepta que los BFs tienen mayor efecto inhibitor sobre los osteoclastos maduros, pero hay autores que sugieren que los BFs que contienen nitrógeno, también impiden la diferenciación de precursores de osteoclastos y su migración hacia lesiones osteolíticas inflamatorias (7). La supresión de los osteoclastos disminuye la angiogénesis ósea. Los osteoclastos tratados con BFs activan el sistema inmune, en particular a las células NK en esta línea, pudiendo tener potencial para establecer inflamaciones crónicas, dirigiendo hacia patologías observadas en paciente con osteonecrosis de los maxilares (8).

Otras células también son capaces de internalizar los BFs por endocitosis, como los osteoblastos, macrófagos, células epiteliales y endoteliales, monocitos circulantes y células neoplásicas (mieloma, carcinoma de próstata) (9). Parece que los BFs actúan sobre los osteocitos y osteoblastos, mediante la reducción de la apoptosis y estimulando la liberación de inhibidores del reclutamiento de osteoclastos. De esta forma los BFs preservarían la función de formación de hueso por osteoblastos maduros y el mantenimiento de la red de osteocitos(10).

De forma adicional, se ha descrito un efecto antiangiogénico en bisfosfonatos como el ácido zoledrónico, a través de la inhibición de las células endoteliales,

mediante la reducción de la proliferación, migración e induciendo la apoptosis in vitro y en roedores(11-13). Sin embargo, otros estudios en roedores no se han constatado disminución del volumen de vascularización tras la administración de BFs(14). En pacientes en tratamiento por metástasis óseas, parece que BFs de gran potencia como el zoledronato o el pamidronato, ocasionan una reducción del VEGF circulante (15).

Otras aplicaciones de los BFs incluyen su administración para la prevención del desarrollo de metástasis óseas (administrado durante la quimioterapia adyuvante) (16), alivio del dolor y la modulación de los sistemas inmune y estromal en la médula ósea. Su actividad antiproliferativa está en estudio, especialmente en el tratamiento de mieloma múltiple, metástasis óseas y sarcomas. Autores adjudican a los BFs propiedades antitumorales directas, posiblemente en relación con la disminución de la liberación de factores de crecimiento y la inhibición de moléculas de adhesión celular(15, 16). Otros autores defienden que la inhibición de la farsenil difosfato sintetasa por los aminobisfosfonatos es clave en el desarrollo de su efecto antitumoral (9). Independientemente de su controvertido potencial para mejorar la supervivencia en pacientes con estadios tumorales avanzados, estos fármacos han demostrado un significativo efecto positivo en la calidad de vida en pacientes con metástasis óseas.

### **Osteonecrosis de los maxilares asociada a bisfosfonatos**

La nomenclatura de “osteonecrosis de los maxilares relacionada con bisfosfonatos” (“bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws” - BRONJ) fue



adoptada por la American Academy of Oral and Maxillofacial Surgeons en 2009 (AAOMS) (17) y ha sido utilizada en gran número de publicaciones desde entonces. Aunque el término BRONJ ha sido tachado de impreciso, por no definir la relación entre los BFs y la osteonecrosis. Autores como Marx defendieron el uso de BIONJ – “bisfosfonate-induced osteonecrosis” (3), remarcando los bisfosfonatos como agentes etiológicos probados. Actualmente la osteonecrosis de los maxilares inducida o asociada a BFs se engloba en el grupo de las “osteonecrosis de los maxilares relacionadas con medicamentos” (“medication-related osteonecrosis of the jaw” – MRONJ), incluyendo otros fármacos antirresortivos, como denosumab (Prolia®) con similar mecanismo de acción, y otros medicamentos antiangiogénicos, como bevacizumab.

MRONJ es la nomenclatura actualmente aceptada para hacer referencia a la osteonecrosis de los maxilares asociada a medicamentos, incluyendo los BFs, desde la actualización de la AAOMS de 2014 (18). No obstante, hemos elegido utilizar la nomenclatura BRONJ para hacer referencia a esta patología en esta tesis debido a que sólo vamos a tratar el efecto adverso ocasionado por los BFs, y al hecho de haber utilizado la nomenclatura BRONJ en las publicaciones y presentaciones de congresos derivadas de este trabajo.

### Definición

La definición de caso de BRONJ según la AAOMS(18), incluye las siguientes características a cumplir:

1. Tratamiento actual o previo con BFs.

2. Exposición ósea o hueso que puede ser sondado a través de una fístula/as intraoral/les en la región maxilofacial que persiste durante más de ocho semanas.
3. No historia previa de tratamiento radioterápico o enfermedad metastásica evidente en los maxilares.

Ésta es una definición clínica de la patología y es suscrita por toda la comunidad científica. Aunque es ampliamente aceptado que la exposición ósea o hueso sondable, es condición *sine qua non* para BRONJ, algunos autores diagnostican esta patología en pacientes que no cumplen este criterio, pero presentan una serie de características no específicas, que incluyen dolor maxilar/mandibular, inflamación gingival u ósea y el desarrollo de fístulas, que actualmente se denomina Estadio 0 de BRONJ(17). El 70% de estos individuos presentan osteolisis con/sin osteoesclerosis asociada, y aproximadamente la mitad de estos pacientes progresan hasta exposición ósea manifiesta(19).

### Estadios

La AAOMS (18, 20) clasifica la osteonecrosis por BFs en estadios clínicos para su diagnóstico:

**Estadio 0:** Pacientes sin evidencia clínica de hueso necrótico pero con síntomas inespecíficos o hallazgos clínicos y radiológicos, incluyendo:

- Síntomas:
  - Odontalgia sin causa odontogénica evidente.
  - Dolor óseo en el cuerpo mandibular que puede irradiar a la

articulación temporomandibular.

- Dolor en seno maxilar, pudiendo asociarse con inflamación y engrosamiento del suelo mandibular.
- Alteración neurosensorial.
- Hallazgos clínicos:
  - Movilidad dentaria sin enfermedad periodontal crónica
  - Fístula periapical/periodontal no asociada a necrosis pulpar por caries, trauma o restauraciones.
- Hallazgos radiológicos:
  - Pérdida o reabsorción de hueso alveolar no atribuible a cambios por enfermedad periodontal.
  - Cambios en el patrón trabecular: Confluencias de hueso cortical y medular hiperdensas y persistencia de hueso sin remodelar en alveolos postextracción.
  - Regiones de osteoesclerosis implicando al hueso alveolar y/o el hueso basilar circundante (en áreas clínicamente sintomáticas).
  - Engrosamiento/oscurecimiento del ligamento periodontal (engrosamiento y esclerosis de la lámina dura y disminución del espacio del ligamento periodontal).
  - Estrechamiento/prominencia del canal del nervio alveolar inferior(21).

Varios estudios han señalado que hasta el 50% de los pacientes en Estadio 0 progresan a estadios 1, 2 o 3(22). Aparentemente el estadio 0 podría tratarse de un pródromos de BRONJ o una variante sin exposición ósea. Por ello la

definición de BRONJ se amplió en 2014 por la AAOMS, incluyendo la presencia de fístulas mucosa o cutáneas con sondaje de hueso, como criterio clínico diagnóstico. Varios grupos de investigación han propuesto modificar la definición de BRONJ incluyendo una nueva variante de BRONJ sin presentar exposición ósea: “osteonecrosis de los maxilares sin exposición ósea” (NE-ONJ) (23-25). Fedele et al, en su estudio multicéntrico publicado en 2015, afirmaba que un cuarto de los pacientes diagnosticados de osteonecrosis, no estarían recogidos en la definición actual de BRONJ de la AAOMS por no presentar exposición ósea. A pesar de la revisión de la clasificación por estadios de 2014 de la AAOMS, que clasifica el estadio 0 como la variante de BRONJ sin exposición ósea, estos grupos diferencian el estadio 0, caracterizado por cambios radiológicos y clínicos no específicos, del NE-ONJ con síntomas y hallazgos diagnósticos de osteonecrosis. Schiodt propone como criterios de NE-ONJ cumplir dos o más de los siguientes: fístula intra/extraoral, dolor maxilo-mandibular, inflamación maxilo-mandibular y/o imagen radiológica de secuestro. Además, de la confirmación histológica del espécimen siempre que se intervenga al paciente (secuestrectomía). Así mismo, NE-ONJ se clasificaría en estadio 1, 2 y 3 siguiendo los criterios de la AAOMS salvo por la no presencia de exposición ósea, según las características subyacentes de la enfermedad (24). Esta variante de BRONJ incluiría algunos de los casos clasificados en estadio 0, pero dejaría otros fuera, que según Schiodt et al, pasarían a formar parte del grupo de *paciente en riesgo* de osteonecrosis de la clasificación de 2009 de la AAOMS (pacientes asintomáticos, sin aparente hueso necrótico, con antecedente de tratamiento con BFs).

Aunque la AAOMS reconoce que la actual definición de BRONJ puede infraestimar la verdadera frecuencia de osteonecrosis por BFs, no sustenta una definición de BRONJ incluyendo únicamente criterios radiológicos. El comité de expertos de la AAOMS en 2014 argumenta que realizar el diagnóstico únicamente con signos radiológicos puede sobreestimar el número de casos, al detectar casos *sugestivos* pero que no son BRONJ. “The International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw” en su revisión sistemática y consenso internacional de 2015(26), expresa su preocupación respecto al Estadio 0 de la clasificación de la AAOMS que podría llevar a un sobrediagnóstico. Los síntomas inespecíficos englobados en el estadio 0, podrían ser manifestaciones de un diagnóstico alternativo. El sobrediagnóstico de BRONJ puede llevar a la suspensión de BFs en pacientes en detrimento de su salud esquelética.

**Estadio 1:** Hueso expuesto/necrótico o fístula sondable a hueso, en paciente asintomático y sin evidencia de infección. Pueden presentar hallazgos radiográficos como los descritos en estadio 0 localizados en la región de hueso alveolar (interrupción de la cortical, ausencia de relleno óseo tras una extracción dental y falta de cicatrización del alveolo).

**Estadio 2:** Hueso expuesto/necrótico o fístula sondable a hueso, con evidencia de infección (dolor, eritema en la región de la exposición ósea, con/sin drenaje purulento). Pueden presentar hallazgos radiográficos como los descritos en estadio 0 localizados en la región de hueso alveolar.

**Estadio 3:** Hueso expuesto/necrótico o fístula sondable a hueso, en pacientes con evidencia de infección y uno o más de los siguientes:

- Exposición de hueso necrótico con extensión fuera del hueso alveolar (a la basilar y rama mandibular, al suelo del seno maxilar y cigoma).
- Fractura patológica.
- Fístula extraoral.
- Comunicación oro-sinusal u oro-nasal.
- Osteolisis con extensión a la basilar mandibular o al suelo del seno maxilar.

### Patogenia

Aunque los primeros casos de BRONJ fueron reportados hace más de una década(27-29), la patofisiología de este efecto adverso de los BFs todavía no ha sido bien dilucidado. Múltiples hipótesis se han propuesto para explicar la localización particular de la osteonecrosis por BFs en los maxilares, incluyendo la alteración en la remodelación ósea o la excesiva supresión de la reabsorción ósea, la inhibición de la angiogénesis, el constante microtrauma, la supresión de la inmunidad innata o adquirida, la deficiencia de vitamina D, la toxicidad de los BFs en los tejidos blandos, la inflamación o infección.

Existen actualmente dos corrientes mayoritarias respecto a la patofisiología de BRONJ(30, 31). La primera teoría llamada “**inside-outside**”, se basa en la inhibición de la actividad osteoclástica y la supresión del recambio óseo, inducidos por los BFs. Esta disminución de la remodelación ósea en conjunto con los microdaños producidos en los maxilares por la masticación y la

inflamación local resultan en una exposición del hueso a elevadas concentraciones de microorganismos patógenos. Estos hechos posibilitan infecciones locales, así como necrosis del tejido óseo en los maxilares y conducir a la subsecuente exposición ósea(32). De forma que la exposición ósea se trataría de un evento tardío. La segunda teoría, llamada **”outside-inside”**, sugiere que una ruptura de la mucosa oral o lesión dental origina el ingreso de bacterias e infección/inflamación local, que unidas a la pobre capacidad de remodelación ósea e inmunosupresión local por BFs, desencadena la necrosis ósea. Es posible que BRONJ sea el resultado de la combinación de estos dos mecanismos, pero parece haber más cofactores implicados en su desarrollo(30). Los modelos experimentales sugieren que esta patología pudiera ser de origen multifactorial.

- Inhibición de la reabsorción osteoclástica y la remodelación

El hueso es un tejido dinámico en renovación constante, por una acción coordinada entre osteoblastos y osteoclastos. Los BFs inhiben la diferenciación y la función de los osteoclastos, incrementan su apoptosis y conducen a una disminución de la reabsorción ósea y de la remodelación ósea (9). La diferenciación y función osteoclástica tiene un rol vital en la cicatrización y la renovación ósea del esqueleto. Si las células óseas mueren sin que se produzca su reemplazo, seguidamente se produce la involución de su vascularización. Pero la osteonecrosis de los maxilares solo ocurre primariamente en el hueso alveolar. Una elevada tasa de remodelación puede explicar la diferente predisposición a la osteonecrosis en los maxilares, en comparación con otros huesos del esqueleto axial o apendicular. La tensión

cíclica diaria a la que son sometidos los maxilares, particularmente durante la masticación, ocasiona frecuentes microdaños y, subsecuentemente, reconstrucción ósea(33). El hueso alveolar tiene una tasa de remodelación diez veces superior a la de la tibia y cinco veces mayor que el hueso basilar mandibular. También la localización a nivel de las regiones molares se explica por un mayor stress en ese hueso, generando una mayor necesidad de remodelado óseo(3, 18). Este hecho justificaría que el hueso alveolar pudiera incorporar mayor cantidad de BFs que otros zonas del esqueleto.

- Inflamación/infección

Las infecciones dentales se incluyen dentro de los factores de riesgo implicados en la patogénesis de BRONJ, con estudios en humanos apoyando esta teoría(34, 35). Aunque las extracciones dentales están presentes en la mayoría de los casos reportados de BRONJ, estas piezas dentales presentaban generalmente enfermedad periapical o enfermedad periodontal(18). Desde estos estudios clínicos, se han realizado modelos en animales demostrando que ambas, inflamación o infección bacteriana y medicación antirresortiva, son suficientes para inducir osteonecrosis en los maxilares(36-41). Un tercio de los pacientes que manifestaron esta necrosis ósea, no presentaban el antecedente de una intervención dentoalveolar. Recientes hipótesis han atribuido su origen a procesos inflamatorios en los maxilares, como periodontitis, caries o enfermedad pulpar, que generan acidificación localizada en los tejidos que puede originar una acumulación de bisfosfonatos solubles. Mientras que los bisfosfonatos unidos a hueso son inertes, los BF solubles son citotóxicos para varios tipos de células y con efecto



dosis-dependiente. La acidosis, también origina un aumento en la actividad de los BF que contienen nitrógeno, incrementando su toxicidad(42).

Numerosos estudios identificaron bacterias, especialmente *Actinomyces*, en los huesos necróticos biopsiados en pacientes con BRONJ. El estrecho contacto con el ambiente séptico bucal podría contribuir a estos hallazgos. La presencia de bacterias ha llevado a estudiar la posibilidad de un biofilm complejo en el hueso expuesto(43). Así mismo, es conocida la estimulación de la reabsorción ósea por las bacterias, por lo que la presencia de microorganismos puede contribuir directamente a la necrosis ósea(26).

- Inhibición de la angiogénesis

La angiogénesis es un proceso que implica crecimiento, migración y diferenciación de las células endoteliales para formar nuevos vasos sanguíneos. Este proceso requiere la unión de moléculas de señal como el VEGF a receptores en las células endoteliales. Esta señalización promueve el crecimiento de neovasos.

Clásicamente se ha considerado la osteonecrosis como una necrosis avascular o interrupción en el aporte vascular(44), apoyando la inhibición de la angiogénesis como una de las principales hipótesis en la patofisiología de BRONJ. El efecto antiangiogénico in vitro de los BFs, y en especial del ZA, se ha comentado en apartados anteriores(12, 45), así como el descenso de los niveles de VEGF en pacientes con cáncer. Incluso autores consideran las caídas en VEGF como factor predictor para el desarrollo de BRONJ (15, 46).

- Toxicidad del tejido blando

Aunque los BFs se unen a la hidroxiapatita en el hueso y afectan principalmente al osteoclasto, se ha descrito toxicidad en otros tejidos (47). Se ha demostrado afectación de los BFs en múltiples tipos de células in vitro, aumentando su apoptosis o disminuyendo la proliferación, incluyendo células del epitelio oral(48). In vivo, todavía no se ha evidenciado este daño directo por BFs a nivel mucoso(49). Los BFs tienen una excreción renal, permaneciendo pocas horas en la circulación, con lo que tienen una concentración tisular mínima, a excepción del hueso. Los BFs podrían ocasionar toxicidad mucosa mediante su liberación local(47), debido a la acidificación generada en procesos inflamatorios/infecciosos periodontales y dentoalveolares que puede originar una acumulación de bisfosfonatos solubles, que sí son citotóxicos(42).

- Disfunción inmunológica

Los BFs estimulan la producción de células T gamma delta, las cuales promueven y mantienen la inflamación mediada por citoquinas(50). Estos linfocitos son capaces de infiltrarse en los tejidos, incluyendo la mucosa oral. Es posible que la apoptosis de gran número de osteoclastos por el tratamiento con BFs, origine una liberación de isoprenil difosfatasa local superior al nivel crítico de activación de las cels T  $\gamma\delta$  en la mucosa oral(51). A su vez, estos linfocitos T activados secretan citoquinas CCL3, potente quimioatractor para la migración de neutrófilos. La posterior depleción de estas células T puede ocasionar una alteración de la respuesta inmune ante la infección(26).

Por otro lado, la aplicación de BFs en combinación con corticoides, otros

inmunosupresores o quimioterápicos en modelos animales ha permitido obtener mayores tasas de osteonecrosis y ulceraciones mucosas post-extracciones dentales, frente a la administración exclusiva de BFs(52-56). La mayoría de los casos de BRONJ se localizan en paciente con cáncer avanzado, recibiendo tratamiento con quimioterápicos(57). Cerca de un tercio de los pacientes que desarrollan BRONJ han estado sometidos a tratamientos corticoideos. Esta medicación que produce una supresión del sistema inmune así como la reducción de la formación ósea ante tratamientos de larga duración, pudiendo contribuir al desarrollo de BRONJ(58).

#### Factores de riesgo para el desarrollo de BRONJ:

**1. Factores en relación a la medicación.** La AAOMS en su revisión de MRONJ de 2014 distingue 2 grupos según las indicaciones terapéuticas y tipo de BP:

- Pacientes en tratamiento por cáncer:

El riesgo de desarrollar osteonecrosis en los maxilares en pacientes con cáncer en ensayos clínicos asignados a placebo se cifra en un 0-0,019% (0-1,9 casos por 10.000 pacientes con cáncer), por lo que esta cifra nos aproxima al riesgo que tienen estos pacientes, sin estar expuestos a BFs, de desarrollar osteonecrosis. Los pacientes con enfermedad metastásica son tratados con los BFs más potentes, generalmente con zoledronato, de administración intravenosa. Según la revisión de la AAOMS 2014, teniendo en cuenta sólo estudios con un nivel de evidencia I (revisiones sistemáticas o estudios clínicos

aleatorizados), el riesgo de BRONJ en pacientes expuestos a zoledronato es aproximadamente el 1% (100 casos por 10.000 pacientes). Por lo que el riesgo de desarrollar BRONJ entre los pacientes con cáncer tratados con zoledronato es 50-100 veces superior a los pacientes tratados con placebo(18). Parece que el bisfosfonato más potente, zoledronato, tiene más riesgo de desarrollo de esta complicación en pacientes con metástasis óseas, que el pamidronato.

- Pacientes en tratamiento por osteoporosis:

Pacientes en tratamiento **oral** por osteoporosis con BFs orales durante menos de 4 años tiene un riesgo estimado del 0,1% (10 casos por 10.000 pacientes) según un estudio de 13.000 pacientes en 2010. En tratamientos BFs orales de más de 4 años de duración , el riesgo aumenta: 0,21 % (21 casos por 10.000 pacientes)(59). En otros estudios se han reportado incidencias mucho más pequeñas, como se refleja en la revisión de la AAOMS 2014, aunque en muchas ocasiones pueden deberse a la restrictiva definición de BRONJ que da lugar a una infradiagnos, a la falta de instrucción y seguimiento de los pacientes y a la falta de reporte de los casos por parte de los facultativos asistentes.

Paciente en tratamiento **intravenoso** (dosis anual de zoledronato) por osteoporosis, estudios a 3 y 6 años cifran el riesgo de BRONJ en 0,017% (1,7 casos por 10.000 pacientes)(60, 61), aproximándose al riesgo de osteonecrosis de los grupos placebo (0-0,02%).

El riesgo de desarrollar BRONJ en pacientes en tratamiento con BFs por osteoporosis es 100 veces menor que el riesgo de desarrollar esta patología en pacientes en tratamiento por cáncer(18). La incidencia de osteonecrosis en

pacientes en tratamiento por osteoporosis es muy baja, 0,15-0,001% persona/año de exposición, siendo mínimamente superior a la frecuencia observada en población general(26).

- Tiempo de terapia con BFs:

La duración del tratamiento parece ser el factor de riesgo más importante en el desarrollo de BRONJ, independientemente de la indicación del tratamiento. En los paciente en tratamiento por cáncer con zoledronato la incidencia de BRONJ aumenta desde 0,6% en el primer año, a 0,9% el segundo año y 1,3% el tercer año(62). BRONJ se desarrolla de media a los 48 meses de tratamiento con un BF oral por osteoporosis(21).

En los pacientes en tratamiento por osteoporosis, la incidencia asciende desde cifras cercanas a 0% al inicio del tratamiento con BFs, a 0,21% a los 4 años de tratamiento(63). BRONJ ocurre tras una media de 33 meses de tratamiento en pacientes tratados con BFs intravenosos por cáncer(21).

## 2. Factores locales:

- Tratamiento quirúrgico.

La **cirugía dentoalveolar** se considera el principal factor de riesgo para el desarrollo de BRONJ. La extracción dental es un evento traumático que genera un gran daño estructural, con discontinuidad en la mucosa y exposición ósea. Para su adecuada cicatrización y cierre de la herida precisa de una regeneración tisular orquestada. La supresión de la remodelación ósea por los BFs, impide la eliminación del hueso antiguo o dañado y su reemplazo por

nuevo hueso, por lo que parece reducir la cicatrización alveolar tras una extracción dental. Otras vías de afectación por BFs a la cicatrización osteomucosa postextracción son la alteración del sistema inmune, promoviendo la inflamación mediada por citoquinas, la inhibición de la neoangiogénesis y la posible toxicidad mucosa local.

En la literatura, 52-68 % de los pacientes con BRONJ presentaron el antecedente de una extracción dentaria(18, 57). Así, los procedimientos dentales pueden ser el factor precipitante para el desarrollo de BRONJ siendo un antecedente común en la mayoría de los pacientes(64).

Se estima en un 0,5% el riesgo de osteonecrosis por BFs orales tras extracciones dentales. El riesgo de BRONJ tras extracciones y BFs intravenosos se estima en un rango 1,6-14,8%(18).

La inflamación y la infección bacteriana se encuentran en la mayoría de las lesiones necróticas asociadas a BFs. La enfermedad apical y periodontal parecen exacerbar el riesgo de BRONJ postextracción en modelos animales y en humano, siendo estos procesos inflamatorios reconocidos como precipitantes(18, 39, 41, 65).

- Factores anatómicos:

La localización de las osteonecrosis por asociadas a BFs es más frecuente en mandíbula (73%) que en maxilar (22,5%), pero puede aparecer en ambas localizaciones al mismo tiempo (4,5%)(66). Estas lesiones son más prevalentes en áreas óseas prominentes cubiertas por mucosa fina como torus, exostosis y el reborde milohioideo(26). El uso de dentaduras también se ha asociado con el riesgo incrementado para el desarrollo de BRONJ en pacientes en

tratamiento con ZA en pacientes con cáncer(67, 68).

A pesar de que BRONJ es exclusiva de los maxilares por definición, también se han descrito osteonecrosis del conducto auditivo externo en pacientes en tratamiento por BFs(69-71).

- Enfermedad oral concomitante:

Enfermedad inflamatoria dental pre-existente como enfermedad periodontal y periapical, son reconocidos factores de riesgo, presentes en el 50% de los casos de MRONJ en pacientes con cáncer(66, 72, 73). Debido a que el tratamiento de enfermedad inflamatoria dental comúnmente implica extracción dental, enfermedad dental pre-existente puede confundir la relación entre las extracciones dentales y el riesgo de BRONJ.

### **3. Factores demográficos, sistémicos y otras medicaciones**

La edad y el sexo son factores de riesgo para BRONJ descritos de manera variable. La mayor prevalencia de esta complicación en la población femenina es probablemente el reflejo de la enfermedad subyacente por la cual se prescribieron los BFs (osteoporosis, cáncer de mama...)(35, 66, 73). Sobre la incidencia de BRONJ en población infantil existe muy poca bibliografía(74). En el estudio observacional de Brown, 42 pacientes pediátricos (11 con tratamientos dentales invasivos) con BF intravenoso, la incidencia fue de 0%(75).

Los corticoides están asociados con un incremento del riesgo de BRONJ(66, 73). La asociación de agentes antiangiogénicos a BFs se asocia con un

aumento del riesgo de osteonecrosis(76).

Comorbilidades entre los pacientes con cáncer se han asociado de forma inconsistente con el riesgo de BRONJ, incluyendo la anemia (hemoglobina <10g/dL) y diabetes(66, 73). El tipo de tumor por el cual los pacientes reciben tratamiento también se ha descrito como factor de riesgo variable(67)

El tabaco se ha asociado de manera inconsistente como factor de riesgo para el desarrollo de BRONJ(67, 68, 73, 77).

#### **4. Factores genéticos**

Diversos estudios han descrito polimorfismos de un único nucleótido asociados con el desarrollo de osteonecrosis. La mayoría de estos polimorfismos se han localizado en regiones de genes asociados con el recambio óseo, formación de colágeno o ciertas enfermedades del metabolismo óseo(77-79). En conjunto, los estudios sugieren que puede existir una sensibilidad determinada genéticamente.



## II. Tratamiento de la osteonecrosis asociada a bisfosfonatos

### **Prevención de BRONJ**

La valoración y tratamiento dental de los pacientes previo al inicio del tratamiento con BFs, ha demostrado reducir de manera importante el riesgo de osteonecrosis asociada a estos fármacos(26, 66, 68, 80, 81).

Previo a la instauración del tratamiento con BFs, el paciente debe someterse a una exploración dental exhaustiva clínica y radiológica (ortopantomografía, radiografías periapicales) para detectar y tratar infecciones odontogénicas, piezas en mal estado que requieran tratamiento, enfermedad periodontal, prótesis inestables y en limitados casos, realizar extracciones. Resulta importante identificar infecciones agudas así como potenciales infecciones futuras que podrían exacerbarse tras la instauración de los BFs y otros tratamientos concomitantes (corticoides, quimioterápicos, antiangiogénicos).

El protocolo más consensuado en el momento actual, previo al tratamiento con BFs, especialmente en pacientes en tratamiento por cáncer, se resume a continuación:

- Piezas con movilidad acusada (grado III), focos apicales de gran tamaño o en piezas ya endodonciadas, piezas con caries no restaurables y restos radiculares se aconseja extracción(21).
- Piezas con movilidad leve (grado I y II) en pacientes con buena higiene oro-dental: se aconseja ferulización de las mismas a piezas adyacentes. Si el paciente presenta mala higiene bucodental se aboga por extracción(82).

- Piezas dañadas con buen pronóstico (focos apicales de pequeño tamaño, caries restaurables), se recomienda su restauración/endodoncia lo antes posible. Si no desea el paciente realizar el tratamiento, se aconseja extracción.
- Piezas semiincluidas: se prefiere su extracción(21). Piezas incluidas con cobertura ósea: No está indicada su extracción(83).
- Prótesis removibles inadecuadas: modificar, rebasar o reemplazar por su dentista para evitar decúbitos, especialmente en cara lingual mandibular/torus(21).
- Extracciones: Se han de realizar de la forma más atraumática posible, primando la odontosección a la ostectomía.
  - Tratamiento antibiótico posterior según complejidad de la cirugía: Amoxicilina-clavulámico o en alérgicos: clindamicina, metronidazol, quinolonas.
  - No se recomienda introducir la medicación antirresortiva hasta completar la cicatrización mucosa (14-21 días), siempre y cuando la patología de base del paciente lo permita(18).
- Se ha de instruir al paciente sobre el riesgo de BRONJ, especialmente ante extracciones y la necesidad de higiene buco-dental y fluorización (controles periódicos por su dentista, cada 6 meses en tratamientos por cáncer)(18). El paciente ha de reportar la presencia de inflamación/exposición ósea a su odontólogo/cirujano maxilofacial para la prevención del desarrollo de BRONJ y detección de esta patología en estadios precoces.

Los pacientes en tratamiento con BFs por osteoporosis pueden desarrollar BRONJ, pero su frecuencia es mucho menor y los estadios menos avanzados que en aquellos pacientes en tratamiento con BFs intravenosos por cáncer. BRONJ puede aparecer de manera espontánea o tras un trauma pequeño. En general estos pacientes parecen tener menos manifestaciones graves de osteonecrosis y responder de manera más rápida al tratamiento específico según estadio.

La eficacia de marcadores sistémicos del recambio óseo para valorar el riesgo de desarrollo de BRONJ en pacientes en riesgo, como el telopéptido C terminal, no está validada científicamente, por lo que no son recomendados por la AAOMS 2014(18). Según la revisión sistemática de Dal Pra KJ et al de 2016(84), el telopéptido C terminal no tiene valor predictivo para determinar el riesgo de osteonecrosis en pacientes en tratamiento con BFs. Otros biomarcadores de remodelación ósea como telopéptido N terminal, fosfatasa alcalina u osteocalcina, tampoco han demostrado utilidad en el manejo de paciente en riesgo de desarrollo de BRONJ(26).

El protocolo de actuación frente a pacientes con sintomatología dental y en tratamiento con BFs, se resume en:

1. Pacientes en tratamiento con BFs orales por osteoporosis:

- La cirugía dentoalveolar electiva e implantes no están contraindicados, pero el riesgo de BRONJ es mayor en tratamientos superiores a 4 años(18, 85). Existe escasa evidencia científica, pero se recomienda profilaxis antibiótica perioperatoria(86).

- Ante tratamiento con BFs orales inferior a 4 años, sin factores de riesgo (tratamiento corticoideo, medicación antiangiogénica concomitante, diabetes, artritis reumatoide, hábito tabáquico): no es preciso el retraso del procedimiento dental/quirúrgico(18, 26).

- En pacientes con tratamiento con BFs orales con factores de riesgo o tratamientos superiores a 4 años, se recomienda:

- Piezas con movilidad I-II: ferulización de las mismas.
- Piezas con movilidad grado III o movilidad I-II con foco dental o periodontales: recomendada la extracción de dichas piezas y profilaxis antibiótica. Antisépticos orales(83).
- Preferible tratamiento endodóntico a quirúrgico.
- Los implantes no está contraindicados, pero existe riesgo de pérdida a corto/largo plazo así como BRONJ(21).
- “Drug holiday” antes de extracciones o procedimientos invasivos: recomendable, si es posible, la suspensión de BFs orales(18, 21) 2 meses pre-cirugía y hasta 3 meses post-cirugía o hasta completar la cicatrización ósea (no evidencia científica)(87, 88).

2. Las pautas de actuación recomendadas en pacientes en tratamiento con BFs intravenosos por cáncer y con patología dental o periodontal:

- Piezas cariadas no restaurables: se recomienda amputar corona y endodoncia del resto radicular(18).

- Piezas con movilidad I-II: ferulización. Movilidad grado III o movilidad I-II con foco dental o periodontales: Extracción con profilaxis antibiótica(21):

- Penicilinas

- En alérgicos a penicilinas: clindamicina, quinolonas-metronidazol, eritromicina-metronidazol
  - Antisépticos orales (clorhexidina 0,12%, povidona iodada 10%)(89)
- Desaconsejados cirugía electiva e implantes en estos pacientes.
  - Supresión de la medicación antirresortiva previo a la cirugía invasiva: no existe evidencia científica.
  - Algunos autores recomiendan el cierre del alveolo con colgajo mucoperióstico(89).

### **Tratamiento de BRONJ establecido**

No existe evidencia científica extraída de estudios controlados aleatorizados que guíe el tratamiento de los pacientes con BRONJ(90). Actualmente no existe un tratamiento “gold standard” para BRONJ. Los objetivos más importantes en el tratamiento de pacientes con BRONJ son en el control del dolor, la infección (si existe) y la progresión de la necrosis ósea. Estos pacientes deberían evitar cirugías dentoalveolares electivas, ya que el riesgo de desarrollo de nuevas áreas de osteonecrosis es elevado. A excepción de los casos más avanzados (Estadio 3) o ante secuestros bien definidos, resulta prudente considerar en primera instancia terapias no quirúrgicas y si estas fallan, abordar terapias más invasivas. No obstante, independientemente del estadio, las áreas necróticas son una fuente constante de irritación de los tejidos blandos y los secuestros óseos deberían ser eliminados o bien remodelados para eliminar aristas y conseguir una cicatrización óptima. Falta

evidencia científica respecto al tratamiento de BRONJ, con escasos estudios aleatorizados en marcha o realizados(90). No existe un consenso general para el tratamiento de BRONJ, pero sí unas pautas de tratamiento recomendadas por las principales asociaciones, como la AAOMS en 2014(18) y la “American Society for Bone and Mineral Research” en 2015(26).

Las estrategias de tratamiento se resumen según el estadio de BRONJ diagnosticado, con el objetivo de minimizar la morbilidad y preservar la función:

### Estadio 0:

Tratamiento sintomático y manejo conservador de los factores de riesgo locales (piezas en mal estado, enfermedad periodontal, dentaduras/decúbitos)(18). Antisépticos (enjuagues con clorhexidina 0,12%).

Tratamiento médico para control del dolor crónico e infección, con analgésicos/antiinflamatorios y antibióticos cuando exista sospecha de infección.

Seguimiento estrecho del paciente para detectar consecución en un estadio más avanzado, así como descartar otros diagnósticos con signos radiológicos similares, como enfermedad fibro-ósea o osteomielitis esclerosante crónica.

### Estadio 1:

Existen muchos y heterogéneos protocolos defendidos por diversos grupos de investigación. La AAOMS recomienda el tratamiento conservador de estos pacientes incluyendo los lavados con agentes antimicrobianos (clorhexidina 0,12% 3 veces/día) y desaconsejan tratamiento quirúrgico inmediato, salvo en casos de secuestros óseos con movilidad del fragmento. La extracción de

piezas sintomáticas en áreas de hueso necrótico expuesto, se aconseja por la AAOMS por resultar improbable que este acto exacerbe el proceso necrótico ya establecido.

Otros autores defienden, que siempre que no se obtenga mejoría con el tratamiento médico, se practique remoción completa del hueso necrótico (secuestros y hueso superficial amarillento), lo más conservadora posible. Siempre se ha de realizar análisis anatomopatológico del hueso resecado, especialmente en pacientes con cáncer para descartar la presencia de metástasis.

Se aconseja la regularización suavizando rebordes óseos (con fresa redonda o piezoeléctrico). Numerosos grupos aconsejan cobertura del lecho intervenido con un colgajo local, sin tensión, y cierre en doble capa(21, 91, 92). Se pretende así evitar la contaminación bacteriana y aumentar el aporte sanguíneo al hueso afectado por BFs durante la cicatrización.

Salvo en el caso de secuestros, practicar una resección en un caso de BRONJ implica delimitar, lo que no suele ser sencillo, el hueso necrótico y hueso no necrótico, aunque afectado por los BFs. Se han propuesto técnicas de fluorescencia para guiar la resección, con ayuda de lámparas de fluorescencia. En primer lugar se propuso fluorescencia ósea por tetraciclinas, generalmente 7-10 días doxiciclina/minociclina previo a la intervención (93-96) y luego la auto-fluorescencia ósea del hueso viable(97, 98), para llevar a cabo resecciones guiadas. Las publicaciones han mostrado tasas de curación superiores al 90%, pero son precisos estudios aleatorizados con mayor número de pacientes y grupos control, que avalen estos resultados para poder estandarizar la técnica.

Estadio 2:

Tratamiento con enjuagues antimicrobianos en combinación con terapia antibiótica. Aunque la infección local del hueso y tejidos blandos no se considera etiología primaria de este proceso, la colonización del hueso expuesto es común. La mayoría de los microorganismos aislados son sensibles a penicilinas. Quinolonas, metronidazol, clindamicina, doxiciclina y eritromicina han sido utilizados con éxito en aquellos pacientes alérgicos a penicilinas. Se recomienda cultivo antimicrobiano y antibioterapia dirigida. La formación de biofilm sobre el hueso expuesto se ha descrito como posible causa en casos refractarios al tratamiento antibiótico. Según la AAOMS, en dichos casos, la reducción del volumen de hueso colonizado y necrótico puede ser beneficioso, en conjunción con la antibioterapia.

Otros autores abogan por un desbridamiento quirúrgico del hueso necrótico, defendiendo una resección conservadora pero completa y siempre con tratamiento antibiótico y antiinflamatorio pre y post intervención(21, 91).

Estos pacientes siempre han de tener un control estrecho.

Estadio 3:

En estos pacientes, la cirugía invasiva está indicada si puede mejorar la calidad de vida del paciente. En caso contrario o ante la negativa del paciente, se procederá al control de los síntomas y prevención de la progresión de la osteonecrosis mediante medidas locales (saneamiento, desbridamiento que aporte confort, clorhexidina, evitar tabaco) o fármacos(99).



Se aconseja desbridamiento amplio con resección del hueso necrótico: osteotomías marginal/segmentaria en casos graves. Ante BRONJ refractaria, se aconseja resección de mayor agresividad (osteotomía segmentaria)(99). Tras grandes resecciones puede ser necesario reconstruir con una placa de reconstrucción o un obturador. El potencial de fallo de la placa de reconstrucción por la afectación de los BFs al hueso remanente debe tenerse presente.

Reconstrucciones inmediatas con hueso vascularizado han sido descritas para estadios avanzados y refractarios de BRONJ, con resultados exitosos pero en pacientes seleccionados(100-102), que suponen una muestra muy pequeña como para extrapolar resultados.

### III. Células troncales

#### **Células troncales mesenquimales**

Las células troncales mesenquimales (mesenchymal stem cells – MSCs) son células progenitoras estromales pluripotentes y están teniendo un uso creciente en la medicina regenerativa. En 2006, “The International Society for Cellular Therapy” propuso unos criterios fenotípicos mínimos para la definición de MSCs:

- 1) Adherencia al plástico en las placas de cultivo.
- 2) Expresión de CD105, CD73, CD44 y CD90 en más del 95% de la población de MSCs y ausencia de expresión de al menos 3 de los siguientes marcadores CD34, CD45, CD31, CD14 o CD11b, CD79a, CD19 y marcadores HLA II (menos del 2% de la población deberían expresar estos marcadores).
- 3) Potencial capacidad de diferenciación en osteoblastos, condrocitos y adipocitos in vitro(103).

Esta sociedad también especificó en ésta declaración, el CD34 como marcador negativo para MSCs, pero publicaciones recientes muestran que este marcador debe ser evaluado en el contexto del tejido desde el cual las MSCs se aíslan.

Las MSCs contribuyen activamente a la organogénesis durante la el desarrollo embrionario y posteriormente, al mantenimiento de los tejidos adultos. En la edad adulta, las MSCs normalmente se aíslan del estroma de la médula ósea o de tejido adiposo pero también están presentes en otros tejidos (pulpa dental, cordón umbilical,...). Debido a su habilidad para diferenciarse en

osteocitos, pero más importante debido a la secreción de numerosas citoquinas con actividad inmunomoduladora, anti-inflamatoria, anti-microbiana y proangiogénica, las MSCs han emergido como candidatas para el tratamiento de BRONJ(103, 104).

- Efectos inmunomoduladores de las MSCs:

El sistema inmune innato está constituido por tres tipos de células: Natural Killer (NK), células dendríticas y macrófagos. Las células NK están implicadas en la defensa antitumoral y antiviral y se encargan de eliminar células infectadas o tumorales sin restricción MHC1. Las MSCs son capaces de inhibir la proliferación de las células NK mediante la secreción de indolamina 2,3-dioxigenasa y prostaglandina E2 (PGE2). Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos que conectan el sistema inmune innato y el adaptativo. Las MSCs ejercen un efecto inhibitorio en la diferenciación de las células dendríticas a través de factores como IL-6 y PGE2 y el contacto célula-célula(105). Los macrófagos son células fagocíticas derivadas de monocitos y se dividen principalmente en dos categorías: Macrófagos M1 promueven la reacción proinflamatoria y los macrófagos M2 principalmente implicados en la cicatrización de las heridas. Existe una relación temporal entre los macrófagos M1 y M2: macrófagos M1 inflamatorios predominan en los estadios iniciales de las lesiones tisulares y a continuación, los macrófagos M2 se convierten en los predominantes. El estadio de los macrófagos M1 es necesario para eliminar el tejido necrótico o agentes infecciosos y el estadio de los macrófagos M2 permite la resolución de la herida(106). Este equilibrio entre estos dos fenotipos constituye un importante objetivo para futuras terapias y puede ser influenciado

por las MSCs. Las MSCs promueven la proliferación de los macrófagos M2 sobre los M1 mediante el aumento de los niveles de IL-4 e IL-13 y la disminución de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6.

El sistema inmune adaptativo está compuesto fundamentalmente por las células T y B. Los efectos de las MSCs sobre las células B no está del todo claro, pero hay estudios que apuntan a que las MSCs son capaces de inhibir la diferenciación de las células B y disminuir la producción de inmunoglobulinas(107). El papel de las MSCs en la modulación de las células T depende del subtipo de célula T. Las MSCs son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T citotóxicos y generar células reguladoras CD8<sup>+</sup> en condiciones de co-cultivo(108). Las MSCs también mantienen la proliferación de las células T reguladoras mediante la secreción de IL-10, PGE2 y TGF- $\beta$  y promoviendo la expresión de Foxp3. Las MSCs inhiben la proliferación de linfocitos T helper Th1, Th2 y Th17, sin conocerse exactamente dicho mecanismo. Pero se ha observado en modelos de alotransplante de MSCs que estas células aumentan la actividad de los linfocitos Th2 en autoinmunidad no dominada por Th2(109).

Las MSCs necesitan ser activadas previamente por Interferón- $\gamma$ , para ejercer sus efectos inmunomoduladores, los cuales pueden explicar sus efectos en la inflamación(110, 111).

- Efectos terapéuticos de las MSCs en BRONJ:

Los potenciales efectos inmunomoduladores de las MSCs en el tratamiento de BRONJ ya son objeto de varios estudios. Injertos de MSCs se han realizado en roedores, cerdos y humanos(55, 112, 113). Los estudios apuntan a que la

clave del éxito obtenido por las MSCs está en relación con sus propiedades inmunomoduladoras más que con su posible diferenciación en osteoblastos(105).

MSCs administradas exógenamente migran hacia los tejidos dañados, donde participan en la reparación tisular. Su comunicación con el microambiente inflamatorio es una parte esencial en este proceso(111).

La eficacia de los injertos de MSCs es dependiente de su capacidad para disminuir los niveles de IL-17, IL-6, proteína C reactiva y linfocitos T helper 17 y aumentar los niveles de IL-10, TGF-  $\beta$ 1 y linfocitos T reguladores(55, 112). Aunque las MSCs son capaces de diferenciarse en precursores de osteoblastos(114), no existe evidencia de que los injertos de MSCs participen directamente en la regeneración ósea mediante la diferenciación ósea. La supervivencia media de éstos injertos es de 1-2 semanas, siendo este espacio de tiempo no consistente con una regeneración ósea directa y sí más con un efecto indirecto(115). Se han publicado modelos neurológicos en los que las MSCs injertadas no participan de manera directa en la regeneración tisular mediante su diferenciación y tampoco permanecen en el lugar del injerto, a pesar de sus efectos beneficiosos en la regeneración nerviosa(116). Todas estas observaciones dirigen hacia la hipótesis de que los efectos beneficiosos de las MSCs se deben a su capacidad de secreción de citoquinas y factores de crecimiento. Estos factores solubles secretados y factores liberados en vesículas extracelulares, se conocen bajo el término de “secretoma” de las MSCs(117). Este secretoma potencialmente promueve la regeneración tisular endógena, la inhibición de la apoptosis y la angiogénesis. Los efectos antiapoptóticos y antiinflamatorios de las MSCs pueden regular la remodelación

ósea produciendo efectos terapéuticos en BRONJ con buenos resultados clínicos e histológicos en modelo animal(118).

En el trasplante intralesional de células troncales mesenquimales para el tratamiento médico de BRONJ, las MSCs injertadas no son directamente responsables de la regeneración ósea observada en los modelos de BRONJ animales. Sin embargo, sí parecen aportar potenciales beneficios como: 1) reclutamiento y estimulación local o regional de células endógenas para que se diferencien en osteoblastos y consecuentemente se forme hueso(18); 2) impacto beneficioso en la remodelación ósea y 3) propiedades inmunológicas que disminuyan la inflamación. Se han publicado casos (113, 119) y estudios en animales (55, 112, 118) con buenos resultados, aunque son precisos más estudios para valorar su eficacia.

Productos inductores óseos como las BMP-2 se han utilizado para cultivar MSCs para el tratamiento de defectos esqueléticos y enfermedades óseas, promoviendo su diferenciación a tejido óseo y la secreción de factores que promueven la osteogénesis (120).

MSCs también se han descrito como células inmunoprivilegiadas, sin expresión de antígeno leucocitario humano (HLA) II y limitada expresión de HLA-I, una relevante propiedad a la hora de llevar a cabo trasplantes alogénicos. En la actualidad MSCs alogénicas están siendo usadas en diferentes ensayos clínicos (más de 200 ensayos clínicos registrados en [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)).

### **Células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo**

El tejido adiposo es una fuente abundante y accesible de células

mesenquimales (ASCs - Adipose-derived Stem Cells). Un gramo de tejido adiposo puede contener aproximadamente  $2 \times 10^6$  células de las que se estima el 10% son ASCs. Mientras que en un aspirado medular contiene una media de  $6 \times 10^6$  células por mL y solo 0,001-0,01% se estiman como células troncales(104). Varios estudios han comparado células troncales derivadas de la grasa y de aspirado medular con una medición de CFU-F (Unidades formadoras de colonias) 10 veces mayor con ASCs(121). Además, la morbilidad de la obtención del aspirado intramedular es mayor que el de un lipoaspirado.

Las ASCs han sido ampliamente estudiadas desde que se describieran por vez primera en 2001(122) y han mostrado un gran potencial en la mejoría de la cicatrización de heridas(123). Los primeros modelos traslacionales utilizando ASCs se centraron en su potencial **regeneración ósea**, para tratamiento de una gran variedad de defectos (craneal/parietal), craneofacial-palatino, maxilar/mandibular, segmentos tibia-fémur) en roedores, conejos, cánidos y humanos, publicados en la última década(124, 125). En algunos estudios se utilizaron ASCs sin tratamientos previos de las células troncales con agentes osteoinductores, incluidas o no en una matriz (scaffold), con buenos resultados en formación ósea(126-131). Estos resultados contrastan con los de otros grupos con la ausencia de formación ósea obtenida tras la implantación de ASCs sin preinducción(132, 133), lo que hizo especular sobre que el potencial osteogénico de las ASCs debería ser potenciado mediante el tratamiento con factores osteogénicos. Estudio que comparan resultados cicatrización craneal o palatino con ASCs preinducidas (con dexametasona por ejemplo) y ASCs controles, obtienen mejores resultados en los grupos tratados con ASCs

preinducidas (132, 134-136).

En el estudio de la mejora de la capacidad osteorregenerativa de las ASCs se han pretratado o combinado con factores de crecimiento osteogénicos más potentes como las BMPs (BMP2 (137-139), BMP6 (140), BMP7 (141)), con mayor regeneración ósea en los grupos con ASCs pretratados. Estos estudios parecen apoyar que las ASCs con BMPs pueden regenerar hueso y esta formación ósea puede estar potenciada por la acción autocrina de las BMPs sobre las ASCs. Aunque en estos estudios no se evaluó la cantidad de hueso formado debido a la acción única de las BMPs haciendo difícil determinar si las ASCs inducidas por BMPs están favoreciendo la formación de hueso de manera directa, tal como remarca en su revisión P. Zuk en 2013(142). Otros estudios han comparado esta asociación, con resultados mejores en el uso únicamente de BMP2 en comparación con ASCs + BMP2(143-146). Sin embargo, P. Zuk destaca de estos estudios el potencial uso de las ASCs como “bomba celular” mantenida en el tiempo de factores osteogénicos capaces de inducir la regeneración ósea.

La **vascularización** es crítica en la reparación tisular, por ello se han realizado números estudios testando la capacidad de neoangiogénesis de las ASC. Las ASCs tienen potencial para diferenciación en células endoteliales demostrado *in vitro*(147) y también se ha observado incremento en la vascularización en modelos de lesión cardíaca tras infarto, regeneración epitelial(148) y neural, injertos grasos (con aumento de su supervivencia)(149) tanto por su diferenciación directa(150) como por la producción de factores angiogénicos y mediación endógena de vasculogénesis(151), probablemente en relación con la secreción de VEGF.



Las ASCs, como MSCs poseen propiedades inmunomoduladoras e inmunosupresoras, que junto con su baja expresión de HLA I y ausencia de expresión de HLA II, podrían permitir su aloinjerto para regeneración tisular, sin una respuesta inmune importante(142). No obstante, su introducción clínica, progresa con precaución.

## IV. Plasma rico en plaquetas

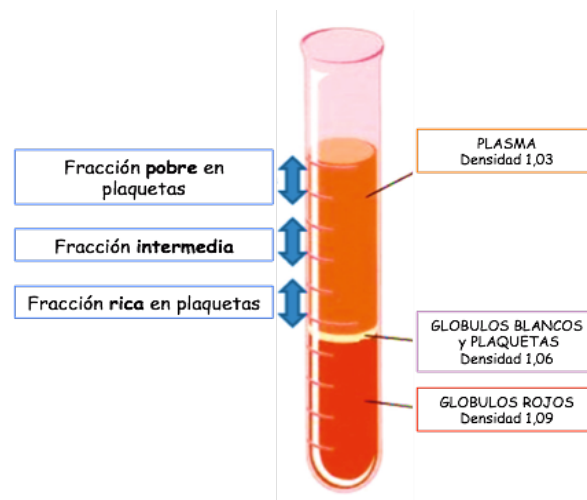


Figura 1. Plasma rico en plaquetas. Esquema de las distintas fracciones obtenidas tras la centrifugación sanguínea (sangre anticoagulada).

El plasma rico en plaquetas (PRP) es una fracción de plasma con una concentración de plaquetas superior a los niveles basales en sangre. El PRP se obtiene mediante doble centrifugación o en gradientes de Ficoll, al separarse en estratos los distintos componentes de la sangre.

Las plaquetas liberan casi el 95% de sus factores de crecimiento presintetizados en la primera hora de su activación y continúan produciendo estas proteínas hasta su senescencia (5-10 días). Las plaquetas producen factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor - PDGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (transforminf growth factor- $\beta$  - TGF  $\beta$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial (VEGF), similar al factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), factor de

crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor de crecimiento hepatocitario (HGF)(152). Estos factores mejoran la angiogénesis, pueden estimular la producción de colágeno, producir un control local de la respuesta inflamatoria, inducir la diferenciación celular y ayudar a la cicatrización de las lesiones tisulares favoreciendo la reducción del dolor y la inflamación(153). Entre las sustancias producidas por el PRP activado, se incluyen proteínas osteoconductoras, con posible aplicación en la regeneración y reparación ósea, favoreciéndola y acelerándola. Así mismo, su utilidad también se centra en su capacidad para empaquetar y retener injertos tanto autólogos como biomateriales, proporcionando estabilidad y adhesión. Como agente osteoconductor y osteoinductor favorece la maduración de los injertos óseos promoviendo la diferenciación osteoblástica.

Dohan Ehrenfest et al (154) definió cuatro tipos de concentrados de plaquetas basado en su contenido en fibrina y leucocitos: fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF), plasma rico en plaquetas y leucocitos (L-PRP), plasma rico en plaquetas puro (PRP) y fibrina rica en plaquetas pura (P-PRF). El PRP es el producto más frecuentemente utilizado en el tratamiento y prevención de BRONJ(155). El L-PRF presenta prometedores beneficios(156) por su contenido en leucocitos que podrían participar en el control de infecciones y regular el sistema inmune(157), mientras que la matriz de fibrina hace más fácil su manipulación durante la cirugía.

Los concentrados de plasma rico en plaquetas autólogos suponen un complemento útil en cirugía, pero no existen guías específicas de uso, estandarización de los parámetros ni de sus propiedades biológicas, con multitud de técnicas de preparación descritas.

Se han publicado series de casos con buenos resultados en el tratamiento de BRONJ refractario con resección del área necrótica y aplicación local de PRP con colgajo mucoso de cobertura(158-163). Se han publicado estudios testando el uso de PRP y cierre mucoso como tratamiento preventivo de BRONJ tras extracciones(164) con mejoría de la epitelización(165). La asociación de MSCs y PRP, parece promover la función de las células troncales debido a la gran cantidad de sustancias liberadas por las plaquetas activadas(166). Una de las vías de investigación en regeneración ósea se centra en la potencial diferenciación osteoblástica(167, 168). Asimismo, la adición proteínas morfogenéticas óseas al PRP parece mejorar sus resultados (169). Son necesarios estudios aleatorizados, homogeneizar los estudios y métodos de elaboración del PRP, que apoyen este tratamiento potencialmente beneficioso para el tratamiento y prevención de BRONJ.

## V. Nuevas líneas de tratamiento de BRONJ

### **Proteínas morfogenéticas óseas**

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son un subgrupo de la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Las BMPs intervienen en el desarrollo y crecimiento del hueso y cartílago. Entre ellas, BMP-2 y BMP-7 son reconocidas inductoras de la formación ósea aprobadas por la *Food Drug Administration* (FDA) en 2001-2002 por sus indicaciones terapéuticas(170). Han sido utilizadas en traumatología y cirugía oral y maxilofacial, incluyendo BRONJ(171). En esta situación clínica, las BMPs son aplicadas durante la cirugía en la cavidad ósea limpia, induciendo la cicatrización exitosa del área necrótica y la formación de nuevo hueso.

Sin embargo, este tratamiento puede mostrar importantes efectos secundarios tras su aplicación, como inflamación, reabsorción ósea, seroma y efectos carcinogénicos, aunque podrían ser dosis dependientes(170). Son precisos más estudios aleatorizados para valorar la seguridad y la eficacia de las BMPs.

### **Oxígeno hiperbárico**

Aunque el oxígeno hiperbárico se ha demostrado una terapia eficaz en el tratamiento de la osteorradionecrosis en cabeza y cuello (172) y utilizado también en el tratamiento de las osteomielitis(173). Se atribuye su efecto cicatrizador al incremento de la concentración oxígeno en los tejidos, la regulación inmunológica y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Aunque existen estudios que muestran una mayor rapidez de

cicatrización y reducción de la inflamación y dolor en pacientes tratados con oxígeno hiperbárico (174, 175), no existe evidencia científica que pruebe su eficacia en el tratamiento de BRONJ, tal como se recoge en la última revisión sistemática de la Cochrane sobre terapias en BRONJ(90). Sólo se ha publicado un estudio aleatorizado controlado utilizando esta terapia oxigénica, como coadyuvante a tratamiento estándar quirúrgico y no quirúrgico, pero con una muestra pequeña de pacientes. A pesar de la aparente mejoría ofrecida por el tratamiento con oxígeno, las diferencias no fueron estadísticamente significativas(176).

### **Terapia con ozono médico**

La terapia con ozono médico actúa mediante la preservación del sistema endógeno antioxidante y bloqueando el sistema xantin-oxidasa. Tiene efecto antimicrobiano, cicatrizador, vasculogénico e inmunoestimulador. Su eficacia en el tratamiento de MRONJ está en valoración, con estudio de fase I-II(177). Se propone como tratamiento coadyuvante sin sustituir al tratamiento recomendado conservador/quirúrgico(178, 179), con buenos resultados en tratamiento del dolor, secreciones y halitosis en series de casos(180).

### **Terapia con láser de baja potencia**

La terapia con láser de baja potencia con láser Er: YAG, Nd: YAG o láser diodo GaAlAs se han descrito de utilidad en el tratamiento y prevención de BRONJ asociado a tratamiento conservador y/o quirúrgico(21). El mecanismo de acción de la terapia con láser de baja potencia parece ser fotoquímico: la energía del fotón es absorbida y convertida en energía metabólica que será

empleada para estimular la mitosis y la síntesis de proteínas. Favorece el proceso reparativo, mejora el índice de osteoblastos, estimula el crecimiento de vasos sanguíneos y capilares(91, 181-183). Proporciona una mejora en la vascularización de la mucosa, regeneración ósea y control del dolor, por lo que parece una efectiva y segura terapia pero no se recomienda su uso en monoterapia sino como complemento(31).

### **Teriparatida**

Este fármaco es una hormona paratiroides recombinante humana y está compuesto por los 34 primeros aminoácidos de la hormona paratiroidea y su administración intermitente tiene efectos anabólicos sobre el hueso. Tiene efectos estimuladores sobre osteoblastos y osteoclastos, estimula la remodelación y la formación ósea, como agente osteoanabólico.

Recientes publicaciones de casos clínicos aislados han mostrado resultados esperanzadores con tratamiento conservador con teriparatida en pacientes osteoporosis y BRONJ ya establecido(184-189), en terapias de corto tiempo de duración. No se aconseja su uso profiláctico en pacientes con BFs orales por osteoporosis por el bajo riesgo de desarrollo de BRONJ. Tampoco se recomienda su uso en pacientes con cáncer, metástasis óseas activas o historia de radioterapia en esqueleto, hasta disponer de más datos sobre su seguridad en estudios prospectivos(26, 190).

### **Pentoxifilina y Tocoferol**

Pentoxifilina y alfa-tocoferol añadido a tratamiento antibiótico, mostraron disminución del área ósea expuesta y de los síntomas en pacientes afectados de

BRONJ en la serie de 6 casos publicada por Epstein en 2010(191). Si bien la experiencia con este tratamiento médico en las osteorradionecrosis es extensa en la literatura, en MRONJ todavía no se dispone de más estudios.



## **HIPÓTESIS**

Hipótesis: Las células troncales mesenquimales derivadas de la grasa, en combinación con plasma rico en plaquetas, activadas o no por BMP-2 , son capaces de disminuir la tasa de osteonecrosis en animales en tratamiento con bisfosfonatos, tras extracciones dentales.

Hipótesis nula: Las ASCs no influyen en la cicatrización tras extracciones dentales en animales tratados con bisfosfonatos.

Hipótesis óptima: La aplicación de ASCs previene el desarrollo de osteonecrosis en animales tratados con bisfosfonatos y extracciones dentales.

## **OBJETIVOS**

1. Desarrollar un modelo animal de osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos, sin utilizar otro fármaco potenciador de la osteonecrosis.
2. Comparar distintos tratamientos potenciales para la prevención de BRONJ tras extracciones dentales, basados en combinaciones de colgajo mucoso y plasma rico en plaquetas.
3. Estudiar la capacidad de las células troncales mesenquimales derivadas de la grasa en la prevención de la osteonecrosis por bisfosfonatos en los maxilares tras extracciones dentales, con y sin co-cultivo con BMP2.
4. Estudiar los efectos de las ASCs en la cicatrización ósea tras extracciones dentales sobre un modelo de BRONJ.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. MODELOS DE OSTEONECROSIS POR BISFOSFONATOS

Durante la búsqueda bibliográfica realizada al inicio del presente estudio en el año 2012, nos encontramos con la inexistencia de un modelo murino estándar de osteonecrosis por bisfosfonatos en los maxilares. Existe gran heterogeneidad en los bisfosfonatos utilizados, dosis, vía de administración, asociación con otros fármacos y cofactores, así como en los resultados obtenidos. Presentamos los resultados de esta búsqueda resumidos en la siguiente tabla.

<b>Autor</b>	<b>Dosis de Bisfosfonato</b>	<b>Asociación con otros fármacos</b>	<b>Cofactores</b>	<b>Porcentaje de osteonecrosis</b>
Sonis et al. 2009	0,075 mg ZA/kg <b>sc</b>	Dexametasona (Dex)	Extracción dental Sutura herida	ZA/Dex 80% ZA 60%
Huja et al. 2009	0,1 mg ZA/kg <b>ip</b>	No	No extracción dental	ZA 0 %
Senel et al. 2010	0,1mg ZA/kg <b>ip</b>	No	Extracción dental	ZA 20 %
Kobayashi et al. 2010	0,250 mg ZA/kg <b>sc</b>	No	Extracción dental	ZA 0 %
Bi et al. 2010	0,125 mg ZA/kg <b>ip</b>	Dexametasona Docetaxel (Doc)	Extracción dental	ZA/Dex/Doc 100% ZA/Dex 27% ZA 0%

Biasotto et al. 2010	0,04 mg ZA <b>iv</b>	No	Extracción dental Defecto de hueso perforado	ZA 100%
Hokugo et al.2010	0,035 mg ZA/kg <b>iv</b>	No	Extracción dental Déficit en Vitamina D (Def Vit D)	ZA/ Def Vit D 66,7% ZA 14,3 %
Lopez-Jornet et al. 2010	3 mg Pam/kg <b>ip</b>	Dexametasona	Extracción dental	Pam 0% Pam/Dex 30%
Aguirre et al. 2010	0,015 mg Alen/kg <b>ip</b>	No	Extracción dental	Alen 40%
Maahs et al. 2011	0,6 mg ZA/kg <b>ip</b> 0,5 mg Alen/kg <b>vo</b>	No	Extracción dental	ZA 80 % Alen 0%
Cankaya et al. 2011	0,075 mg ZA/kg <b>sc</b>	Dexametasona	Extracción dental	ZA/Dexa 60 %
Aghaloo et al. 2011	0,066 mg ZA/kg <b>ip</b>	No	Enfermedad periodontal	ZA 47%
Marino et al. 2012	0,02 mg ZA/kg <b>iv</b>	No	Extracción radicular	ZA 75 %
Aguirre et al. 2012	0,08 mg ZA/kg <b>iv</b> 0,015 mg Alen/kg <b>sc</b>	No	Periodontitis	ZA 50% Alen 0%

Tabla 2 : Resumen de los principales modelos murinos experimentales utilizados en estudios de inducción de BRONJ.

En la tabla se indican los mejores resultados de BRONJ (% de animales que desarrollaron BRONJ) obtenidos en cada modelo experimental, así como la asociación con otros fármacos y cofactores. ZA- Ácido zoledrónico. Pam- Pamidronato. Alen- Alendronato. ip- administración intraperitoneal, iv- administración intravenosa, sc- administración subcutánea, vo- administración oral. Dex - Dexametasona. Doc - Docetaxel. Def Vit D - Déficit en vitamina D

## II. OBTENCIÓN DE UN MODELO DE OSTEONECROSIS MAXILAR POR ÁCIDO ZOLEDRÓNICO EN RATA

Tras la revisión crítica de los modelos animales de osteonecrosis por BFs publicados hasta el año 2013 (Tabla 2), decidimos desarrollar nuestro propio modelo de BRONJ, intentando reproducir la situación clínica real. Por ello realizamos extracciones dentales, como co-factor más frecuente en esta patología. Elegimos en bisfosfonato de mayor potencia relativa (ZA) para incrementar la probabilidad de desarrollo de osteonecrosis y no asociamos ningún otro fármaco que enmascarara el efecto directo de los bisfosfonatos en la cicatrización postextracción.

- Diseño del estudio:

En este estudio se utilizaron 20 ratas Wistar macho (Charlie Rivers, Francia), de 8 semanas de edad media y 350 mg de peso medio. El bisfosfonato utilizado para estudiar el desarrollo de osteonecrosis en los maxilares fue el ácido zoledrónico (Zometa, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland).

Los animales se dividieron de forma aleatorizada en 4 grupos. El ZA o suero salino administrado, la vía y la frecuencia de administración en cada grupo experimental, se resume en la tabla mostrada a continuación:

<b>Grupo</b>	<b>Número de ratas</b>	<b>Dosis</b>	<b>Número de dosis /semana</b>	<b>Número total de dosis</b>	<b>Extracciones dentales</b>	<b>Eutanasia (semanas tras extracciones)</b>
1	5	0,1 mg/kg ZA <b>ip</b>	3	27	Sí	1
2	5	0,1 mg/kg ZA <b>ip</b>	3	27	No	NA
3	5	0,1 mg/kg ZA <b>iv</b>	1	9	Sí	1
4	5	0,1 ml/kg suero salino <b>ip</b> (Control)	3	27	Sí	1

Tabla 3: Distribución animal por grupos en el estudio para la obtención de un modelo animal de BRONJ.

ip- administración intraperitoneal. iv- administración intravenosa, NA – No aplicable

En los grupos tratados con ZA se administraron dosis de 0,1 mg ZA/Kg (192-194). El fármaco se administró peritonealmente en los grupos 1 y 2, tres veces por semana. En el grupo 3 el bisfosfonato se administró por vía intravenosa una vez por semana, a través de una de las dos venas del dorso de la cola. El tratamiento se llevó a cabo durante 9 semanas. En el grupo control se administró el mismo volumen de suero salino, vía intraperitoneal.

Se realizaron extracciones dentales de los 3 molares maxilares derechos en los grupos 1, 3 y 4. Se llevaron a cabo en la octava semana de tratamiento, con los animales en decúbito supino, bajo anestesia general (Ketamina 100mg/kg +

Diazepam 8 mg/kg + Atropina 0,4 mg/kg) y con asistencia de microscopía óptica. (Figura 2). La luxación de los molares se llevó a cabo con un osteotrímer espatulado a modo de botador y con una pinza mosquito como fórceps (Figura 2). Durante los tres primeros días postoperatorios, se administró 0.075 mg/kg/día de Tramadol subcutáneo. Uno de los animales del grupo 3 falleció por problemas ventilatorios en el primer día postoperatorio.

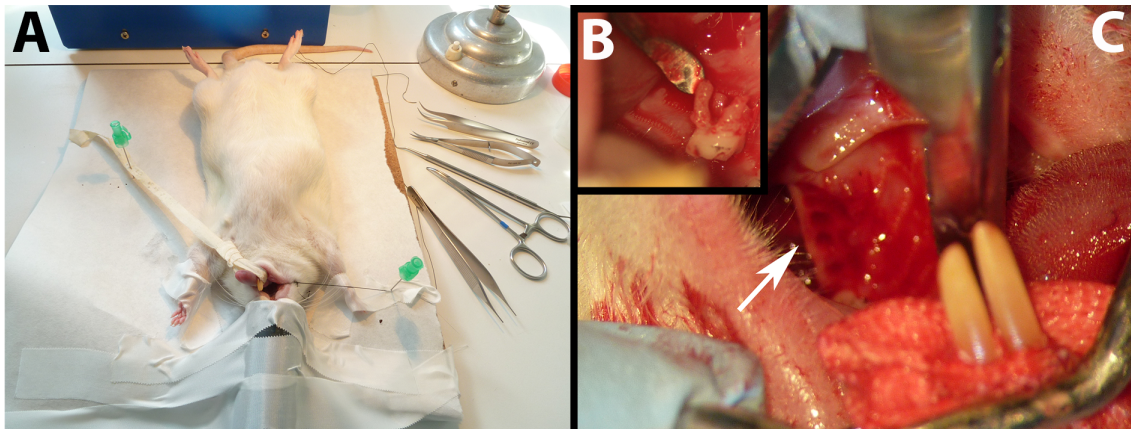


Figura 2: Exodoncia molares maxilar derecho.

A: Preparación del animal para las extracciones.

B: Molar exodonciado.

C: Flecha blanca apuntando hacia los alveolos tras la extracción de los 3 molares.

La eutanasia se llevó a cabo en la novena semana, una semana después de las extracciones dentales. Los animales se sacrificaron bajo anestesia general (Isoflurano inhalado con oxígeno 3 L/min) por decapitación. Las cabezas se recogieron para su posterior análisis.

Este estudio fue aprobado por el comité ético de experimentación animal del Hospital Universitario La Paz (ref. nº 18/2010) y se elaboró siguiendo las guías

de experimentación animal de la Unión Europea. Los animales se mantuvieron en ambiente con temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con comida y agua ad libitum.

- Análisis macroscópico:

Se realizó evaluación intraoral y fotografía de todos los maxilares, valorando la cicatrización de la mucosa visualmente, determinando existencia de hueso expuesto o bien, cicatrización mucosa completa.

- Preparación de las muestras:

Las cabezas se fijaron en formaldehído al 4% y se seccionaron sagitalmente con sierra eléctrica metálica. Se tomaron radiografías simples (PHILIPS Diagnostic 93) de cada hemicabeza.

Las muestras fueron decalcificadas con ácido nítrico 72 horas. Se tomó cada hemimaxilar en bloque y se seccionó sagitalmente el hueso alveolar con bisturí, en fragmentos bucal y palatino/lingual (Figura 3). Los bloques de cada hemimaxilar se incluyeron en etanol 70%, posteriormente fueron deshidratados en soluciones de alcohol en concentraciones descendientes e incluidos en parafina. Los cortes histológicos (5-6  $\mu\text{m}$  de grosor) de cada proceso alveolar se realizaron siguiendo el eje mesiodistal de la pieza y se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico.





Figura 3. Sección sagital del hueso alveolar, para su posterior procesado.

- Análisis histológico

El análisis histológico fue realizado por un patólogo a doble ciego (microscopio óptico con magnificación 40x).

Se evaluaron distintos parámetros:

1. Osteonecrosis o foci necróticos: Definidos por 8-10 lagunas vacías en el hueso alveolar, descrito previamente por Enlow y Yamashita (6, 195).
2. Contaje de osteoclastos: La media aritmética del contaje en 3 campos distintos (40x), en dos cortes diferentes aleatorios del proceso alveolar maxilar.
3. Vascularización: Los procesos alveolares maxilares se evaluaron mediante una escala visual del 1 al 5 (1: ausencia de vasos, 5: duplicación del área ocupada por vasos, en comparación con este área en controles).
4. Grado de remodelación ósea (postextracción dental): Se estableció una escala del 1 al 5 (1: ausencia de reabsorción ósea, 5: 100% de

reabsorción del hueso alveolar y sustitución por tejido fibroso y nuevas trabéculas).

- Análisis radiográfico

Dos cirujanos maxilofaciales evaluaron las radiografías a doble ciego.. La densidad ósea se valoró usando como referencia el valor radiológico densitométrico del hueso sano postextracción del grupo control. Se definieron como hallazgos de osteonecrosis: osteoesclerosis, engrosamiento óseo y desorganización de las trabeculación medular y disrupción de la cortical en el hueso maxilar derecho, comparando con las características de los maxilares derechos del grupo control. Se empleó una escala visual para evaluar los parámetros como presentes o ausentes.

- Análisis estadístico

Las variables cualitativas se analizaron con el Test de Pearson Chi-Cuadrado y el Test exacto de Fisher. Las variables cuantitativas se analizaron con el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis o el Test de U Mann-Witney. Se estableció el nivel de significancia estadística en 0.05 en todos los casos. El análisis de los datos se realizó con el programa SPSS v. 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### III. ESTUDIO DE TRATAMIENTOS PARA LA PREVENCIÓN DEL DESARROLLO DE OSTEONECROSIS MAXILAR POR ÁCIDO ZOLEDRÓNICO EN RATA

- Diseño del estudio:

El objetivo de nuestro segundo estudio fue testar cuatro tratamientos potencialmente preventivos de osteonecrosis, aplicados tras extracciones dentales en animales tratados con bisfosfonatos. Utilizamos el diseño de nuestro modelo de osteonecrosis por bisfosfonatos en rata, desarrollado en el apartado anterior.

En este estudio se utilizaron 56 ratas Wistar macho, adultas, (Charlie Rivers, Francia), de 8 semanas de edad media y 350 mg de peso medio. Todos los animales recibieron ZA intraperitoneal (Zometa 0.1 mg/kg, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) 3 dosis a la semana, durante un periodo de 9 semanas. La dosis total de ZA recibida fue de 1,08 mg de media.

Las extracciones de los 3 molares maxilares derechos se realizaron en la octava semana de tratamiento, con los animales en decúbito supino, bajo anestesia general (Sevoflurano inhalado, 2 ml/min con oxígeno a 1 L/min) y con asistencia de microscopía óptica. Durante los tres primeros días postoperatorios, se administró 0.075 mg/kg/día de Tramadol.

Los animales fueron asignados de forma aleatorizada en 4 grupos:

Grupo 1 (n=14): En estos animales se realizó un colgajo mucoperióstico como cobertura del alveolo dental postextracción, mediante un leve despegamiento subperióstico y avance de la mucosa vestibular. Se realizó un cierre sin tensión con seda de 6/0.

Grupo 2 (n=14): Se aplicó plasma rico en plaquetas (PRP) alogénico en los alveolos postextracción en estos animales. Se realizó el mismo colgajo mucoperióstico descrito en el grupo 1, sirviendo como método de retención y cobertura del coágulo de PRP sobre el hueso alveolar.

Grupo 3 (n=15): Estos animales fueron tratados con células troncales derivadas de la grasa (Adipous Stem Cells, ASCs) alogénicas. 1 millón de ASCs incluidas en un coágulo de PRP se aplicó sobre los alveolos postextracción en cada animal. Se realizó el colgajo mucoperióstico descrito, como retención y cobertura de las ASCs y PRP en el área de interés (Figura 4).

Grupo 4 (n=13): Cada animal de este grupo fue tratado con 1 millón de ASCs co-cultivadas con Proteína Morfogenética 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP-2). Las ASCs fueron aplicadas sobre los alveolos, cubiertas con un coágulo de PRP y el colgajo mucoperióstico sobre éste último.

Todos los animales fueron sacrificados mediante decapitación, una semana después de las extracciones dentales, bajo anestesia general (Isoflurano inhalado con oxígeno 3 L/min).

El estudio fue aprobado por el comité ético de experimentación animal del Hospital Universitario La Paz y se elaboró siguiendo las guías de experimentación animal de la Unión Europea. Los animales se mantuvieron en ambiente con temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con comida y agua ad libitum.

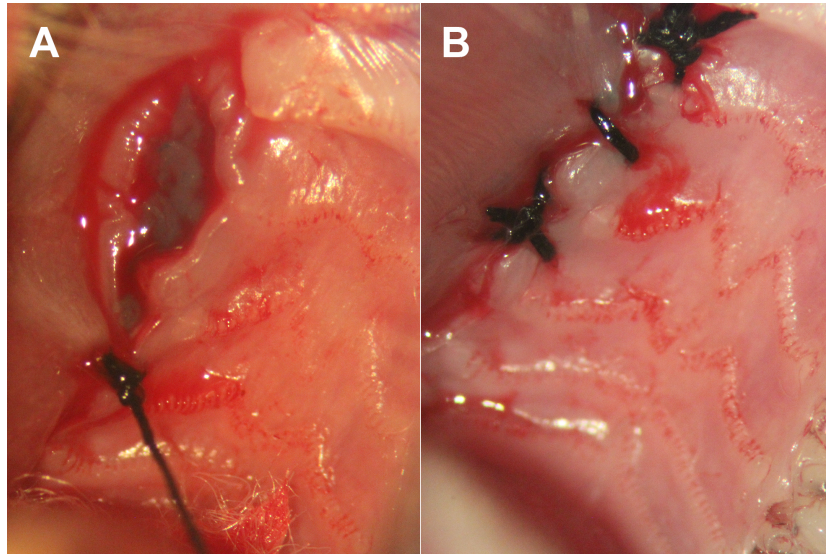


Figura 4: Aplicación de ASCs en el estudio de tratamiento preventivos para el desarrollo de BRONJ.

A: ASCs en coágulo de PRP cubriendo los alveolos tras extracciones dentales en una rata del grupo 3 del estudio.

B: Cobertura de los alveolos maxilares con colgajo mucoperióstico y cierre con sutura continua de 6/0.

- Análisis macroscópico y preparación de las muestras:

Idem a los descritos en el “Modelo de osteonecrosis maxilar por ZA en rata” desarrollado previamente.

- Elaboración del plasma rico en plaquetas:

PRP alogénico se obtuvo de 3 ratas Wistar sanas donantes, mediante punción intracardiaca (obtención de 2 ml de sangre por animal donante) bajo anestesia general (Isoflurano inhalado con oxígeno 3 l/min) y almacenada en tubos con citrato sódico. Éstos tubos fueron centrifugados 10 minutos a 3500 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente. Los primeros 500 µl de

plasma obtenidos en cada tubo (fracción pobre en plaquetas) fueron desechados. Se recogieron 450 µl del plasma de la región más próxima al buffy coat, evitando la capa celular y se volvieron a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos, de esta manera nos aseguramos la ausencia completa de cualquier célula nucleada. Se prepararon alícuotas de 100 µl de PRP y se congelaron a -20°C hasta su utilización, el día de la cirugía.

Para la formación del coágulo, se descongelaron las alícuotas de PRP y a cada 25 µl de PRP se añadió 1,5 µl de  $\text{CaCl}_2$  disuelto en agua desionizada a una concentración de 2,3 mg/ml (10%). Alícuotas de 26,6 µl del volumen final fueron incubadas 3-5 minutos a 37°C hasta la obtención de un coágulo manejable, que será utilizado en los alveolos postextracción (grupo 2) en el espacio de 20-30 minutos tras la activación.

En el grupo 3 (PRP con ASCs), el PRP se preparó del modo anteriormente descrito. Tras la centrifugación de las ASCs a 1500 rpm, un millón de células se re-suspendieron en cada alícuota de PRP antes de la formación del coágulo, por incubación del conjunto a 37° C.

En el grupo 4, las ASCs con BMP-2 no se administraron en un coágulo de PRP debido a la interferencia de las BMP-2 con el  $\text{CaCl}_2$ , impidiendo la activación del coágulo. ASCs con BMP-2 (1 millón de células suspendidas en 25 µl de suero salino) se depositaron sobre los alveolos tras las exodoncias y se aplicó un coágulo de PRP sobre dicha área, cubriéndola con el colgajo mucoperióstico.

- Aislamiento, cultivo, caracterización y marcado celular de las células troncales derivadas de la grasa

Las ASCs alogénicas se obtuvieron del tejido graso subcutáneo de 3 ratas Wistar hembra donantes (los mismos animales utilizados como donantes para la elaboración de PRP) siguiendo el protocolo previamente descrito en humanos con modificaciones menores (Zuk 2001). El tejido graso fue reducido a pequeños fragmentos, lavado con un tampón salino fosfato (PBS) y digerido con colagenasa tipo I (0.075%; Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK). A continuación, la colagenasa se inactivó mediante la adición de igual volumen de Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM; Gibco BRL), que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco BRL). El tejido digerido se centrifugó a 250 g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en 0.16 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 10 minutos a temperatura ambiente para producir eritrolisis. El producto se lavó con PBS, se centrifugó a 250 g durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo; posteriormente se filtró por una malla de nylon de 70  $\mu\text{m}$ . Las células se cultivaron en placas de Petri de ultra baja adherencia, a 37° en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  en DMEM que contiene 10% FBS y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco BRL). Se cambió el medio a las 24 h para eliminar las células no adherentes tras la siembra, y cada 3-4 días posteriormente. Para los subcultivos, al alcanzar el 80-90% de confluencia, las células se despegaron con tripsina-ácido etilendiamintetracético al 0,05% (v/v) (EDTA; Gibco BRL) en PBS. En el tercer subcultivo, al alcanzar la confluencia de 60-70%, las células se congelaron hasta la semana previa a su uso programado.

Para la congelación de las células las placas de cultivo subconfluentes se

lavarón varias veces con PBS, para eliminar cualquier resto de FBS, y posteriormente se despegaron las células del plástico mediante la adición de tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C. Una vez despegadas las células, se inhibió la actividad de la enzima mediante la adición de medio de cultivo con 10%FBS. Posteriormente se centrifugaron los tubos con el producto celular a 350 g durante 10 minutos, durante la centrifugación se realizó el conteo del número de células obtenidas en una cámara de Neubauer por duplicado. El precipitado celular se resuspendió en 0,9mL de FBS por millón de células y posteriormente se añadió un millón de células en criotubos de plástico a los que se agregó 0,1mL de Dimetil sulfoxido (DMSO) para estabilizar las membranas plasmáticas durante el proceso de congelación. Una vez cerrados los criotubos se incluyeron en una rampa de congelación de Isopropanos a -80°C durante 24 horas. Posteriormente, los tubos se pasaron a un tanque de nitrógeno líquido hasta 1 semana antes de su uso.

Para la caracterización de las ASCs, los cultivos celulares se analizaron mediante citometría de flujo de cuatro colores utilizando citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) tras marcaje con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos en cantidades de saturación (siguiendo los protocolos de las casas comerciales): anti-CD90, anti-CD29, anti-CD45 y anti-CD11b conjugados con el fluorocromo Alexa Fluor 647 (Serotec, Spain). Resumiendo,  $2 \times 10^5$  células se incubaron en temperatura ambiente durante 20 minutos, con cada uno de los anticuerpos mencionados. La adquisición y análisis se realizaron mediante el software CELLQuest PRO (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA).



Una vez descongeladas las células, se cultivaron durante 1 semana y antes de ser implantadas en los grupos 3 y 4, se marcaron con tinción fluorescente de seguimiento PKH-26 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. El PKH-26 es una tinción lipofílica que produce un marcaje estable de la membrana celular. Este proceso es simple y rápido. La excitación máxima se produce con ondas de 510-551 nm. La emisión fluorescente se sitúa entorno a 567 nm (espectro amarillo-naranja) y su fluorescencia es extremadamente estable durante más de 100 días. In vivo, tiene una vida media superior a 15 días, lo que permite que en nuestro protocolo se mantenga estable hasta el momento del sacrificio.

Para el grupo 4, las ASCs, tras su descongelación, se cultivaron con 1  $\mu$ m/ml de BMP-2 (Noricum SL, Madrid, Spain) durante 10 días, renovando el medio cada 4 días en condiciones estándar.

Se administraron un millón de ASCs alogénicas en cada maxilar en los grupos 3 y 4, siguiendo el protocolo descrito en el apartado “Elaboración del plasma rico en plaquetas”.

- Análisis histológico e identificación celular:

Se efectuó el análisis histológico por un patólogo a doble ciego (microscopio óptico, magnificación 40x), evaluando los mismos parámetros que los descritos en el “Modelo de osteonecrosis maxilar por ZA en rata” desarrollado previamente.

Se realizó estudio de fluorescencia para la identificación de las ASCs en los cortes histológicos. Se añadió el medio de montaje de la fluorescencia (antifade reagent, solución que previene la pérdida de fluorescencia a corto plazo) con

40,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Prolong Gold; Molecular Probes, Eugene). No se pudo obtener la tinción de los núcleos por DAPI, debido al daño de los mismos por el tratamiento con ácido nítrico durante la decalcificación de las piezas. Los cortes se evaluaron con microscopio de fluorescencia (Leica DMI6000B, Wetzlar, Germany). Las muestras obtenidas en los grupos 1 y 2 (sin ASCs aplicadas) se emplearon como controles negativos.

- Análisis radiográfico:

Idem al análisis descrito en el “Modelo de osteonecrosis maxilar por ZA en rata” desarrollado previamente.

- Análisis estadístico:

Idem al análisis descrito en el “Modelo de osteonecrosis maxilar por ZA en rata” desarrollado previamente.

## RESULTADOS

### I. OBTENCIÓN DE UN MODELO DE OSTEONECROSIS MAXILAR POR ÁCIDO ZOLEDRÓNICO EN RATA

- Resultados macroscópicos:

Ninguno de los animales mostró exposición ósea en los lugares de extracción.

- Resultados histológicos:

Se halló osteonecrosis en el 80% de los animales del grupo 1, en el 25% de los animales del grupo 3 y en el 20% de los controles. Los focos osteonecróticos contabilizados contenían al menos 6-8 lagunas (Figura 5A). La presencia de inflamación aguda, como un absceso, se correlacionó con la presencia de secuestros óseos o restos de alimentos impactados. En el grupo 2 no se hallaron foci osteonecróticos. Se localizó osteonecrosis de manera exclusiva en el hueso alveolar postextracciones dentales.

El valor medio de osteoclastos más elevado se encontró en el grupo control (17,6 osteoclastos/campo a 40x), en contraste con la media de osteoclastos encontrada en el grupo 1 (7,9 osteoclastos/campo a 40x), grupo 2 (7,4 osteoclastos/campo a 40x) y grupo 3 (10,7 osteoclastos/campo a 40x) (Figura 5B), aunque sin significación estadística ( $p=0,184$ ).

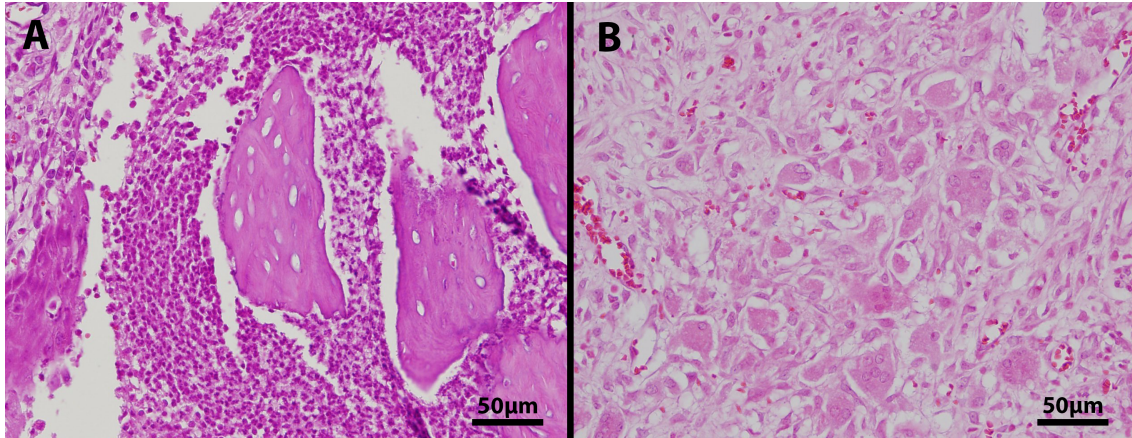


Figura 5. Imágenes histológicas de los alveolos post extracción. Alta magnificación.

A: Focos osteonecróticos rodeados por infiltrado inflamatorio (animal tratado con ZA y extracciones, Grupo 1 estudio puesta apunto modelo BRONJ).

B: Elevado número de osteoclastos en hueso alveolar post extracción en animal grupo control estudio puesta a punto modelo BRONJ

El análisis de la vascularización mostró similar contaje de vasos en grupos 2, 3 y 4 (valor medio de 3,4 en grupo 2; 3,5 en grupo 3 y 3,4 en grupo 4). La vascularización fue menor en el grupo 1, con un valor medio de 2,3. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0,044$ ) al comparar con el resto de grupos.

El análisis de la remodelación del hueso alveolar mostró mínima reabsorción tras las extracciones dentales en los grupos tratados con ZA (Figura 6A), con un valor medio de 1 en el grupo 1 y 2,1 en el grupo 3. Estos resultados contrastaron con los obtenidos en los controles (ver figura 6B), con un valor medio de 4,4. Estas diferencias en la distribución de la reabsorción ósea fueron estadísticamente significativas ( $p=0,004$ ) después del análisis con el test Kruskal-Wallis para muestras independientes. En el grupo 2, la reabsorción ósea del hueso alveolar no se incluyó en la tabla comparativa, debido a que no

se realizaron extracciones dentales en dichos animales y se encontró hueso alveolar ordinario, sin incremento del recambio.

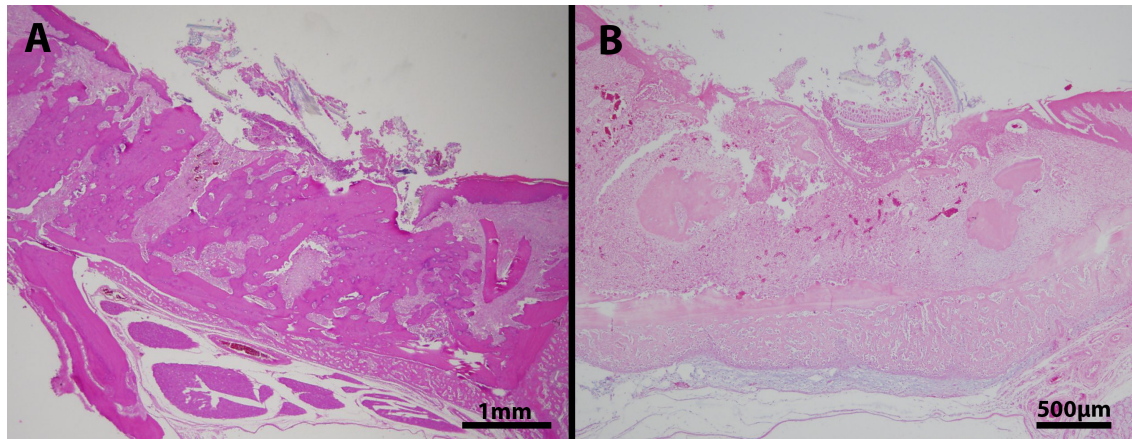


Figura 6: Imágenes histológicas de los alveolos post extracción. Baja magnificación.

A: Tinción Hematoxilina-eosina en un espécimen tratado con ZA y extracciones (Grupo 1 estudio modelo BRONJ) mostrando ausencia de reabsorción ósea y discontinuidad de la mucosa.

B: Especímen del grupo control estudio modelo BRONJ con reabsorción completa del hueso alveolar y sustitución por tejido fibroso (estadio inicial de la cicatrización ósea). Se observan ápices residuales, ocasionados por fracturas radiculares durante las extracciones debido a la anquilosis de las piezas, comúnmente observadas en ratas adultas.

Se observó una cicatrización epitelial incompleta una semana después de las extracciones dentales (punto medio en el proceso de cicatrización tras extracciones dentales en rata (196)) en el 80% de los animales del grupo 1. En el grupo 3, 25% tuvieron resultados similares y el 40% de los animales en el grupo control presentaron cicatrización mucosa incompleta (grupo 4). En la mayoría de los especímenes, la disrupción de la mucosa se halló en

combinación con osteonecrosis o restos radicales remanentes. No se evidenció ulceración mucosa en el grupo 2. No fue posible estimar diferencias estadísticamente significativas.

Se hallaron abscesos presentes en todos los grupos con extracciones dentales: 80% en grupo 1, 50% en grupo 3 y 20 % en grupo 4, en íntima relación con la cicatrización incompleta de la mucosa u osteonecrosis foci. No se observaron abscesos en grupo 2. No fue posible estimar significancia. Los hallazgos histológicos se resumen en la Tabla 4.

<b>Grupo</b>	<b>Osteonecrosis</b>	<b>Osteoclastos /campo x40</b>	<b>Vasc.</b>	<b>Reabsorción ósea</b>	<b>Disrupción mucosa</b>	<b>Infiltrado inflamatorio (Absceso)</b>
1	80%	7,9 (1,5)	2,3 (0,4)	1 (0,0)	80%	80%
2	0%	7,4 (1,1)	3,4 (0,5)	NA	0%	0%
3	25%	10,7 (4,8)	3,5 (0,5)	2,1 (0,8)	25%	50%
4	20%	17,6 (8,7)	3,4 (1,0)	4,4 (0,8)	40%	20%

Tabla 4. Hallazgos histológicos. En la tabla se presentan los porcentajes de animales de cada grupo que mostraron osteonecrosis, disrupción de la mucosa y abscesos. El número de osteoclastos por campo a x40 aumentos, la vascularización (escala 1-5, ver texto) y reabsorción ósea (escala 1-5, ver texto) de cada grupo se presentan como media aritmética (desviación estándar). NA – no aplicable. Vasc – Vascularización.

- Hallazgos Radiográficos:

El análisis de la densidad ósea mostró osteoesclerosis en 80% de los animales del grupo 2 (especímenes tratados con ZA sin extracciones dentales) (ver figura D). En los grupos 1 y 3 (animales tratados con ZA con extracciones dentales), el porcentaje de osteoesclerosis en el hueso alveolar descendió a 25% y 50% respectivamente.

Engrosamiento óseo y desorganización trabecular se encontraba presente en 100% de los animales del grupo 2 (ver figura 7D). Este porcentaje fue menor en los grupos con extracciones dentales: 80% en el grupo 1 y 25% en el grupo 3.

El 100% de los animales en el grupo 1 presentaron disrupción de la cortical alveolar en el maxilar derecho (figura 7B). 50% de los animales en grupo 3 y 20% en grupo 4 (controles) mostraron hallazgos similares. No se evaluó la presencia de disrupción cortical en el grupo 2, debido a que no se realizaron extracciones dentales en este grupo.

Los hallazgos radiográficos se resumen en la Tabla 5. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas tras el análisis de las características radiográficas.



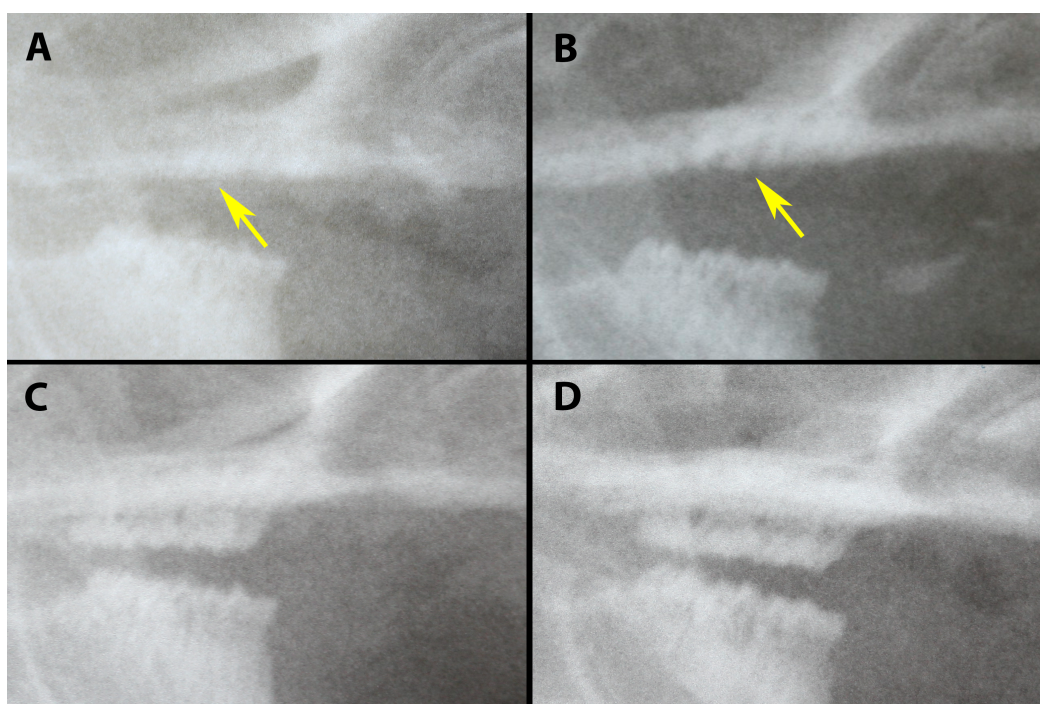


Figura 7: Hallazgos radiológicos.

A: Especimen control con extracciones: el área de extracción presenta un reborde alveolar bien definido (flecha amarilla)

B: Animal tratado con ZA mostrando interrupción de la cortical en el hueso alveolar maxilar y áreas de radiodensidad mixtas (flecha amarilla)

C: Especimen control sin extracciones con densidad y patrón trabecular normal.

D: Osteoesclerosis y engrosamiento del hueso maxilar ante tratamiento con ZA y sin extracciones dentales.

Grupo	Osteoesclerosis	Engrosamiento óseo / Desorganización trabecular	Disrupción cortical
1	40%	20%	100%
2	80%	100%	NA
3	50%	25%	50%
4	0%	0%	20%

Tabla 5. Hallazgos radiográficos.

En esta tabla se resumen los porcentajes de osteonecrosis, engrosamiento óseo y disrupción cortical en cada grupo de animales. NA – No aplicable.



## II. ESTUDIO DE TRATAMIENTOS PARA LA PREVENCIÓN DEL DESARROLLO DE OSTEONECROSIS MAXILAR POR ÁCIDO ZOLEDRÓNICO EN RATA

- Resultados macroscópicos:

No presentaron exposición ósea los maxilares intervenidos en ninguno de los animales.

- Resultados histológicos:

Un espécimen del grupo 1 y tres especímenes del grupo 2 fueron excluidos del análisis final debido a problemas técnicos con la histología, especialmente durante el corte de las piezas.

Se encontraron focos osteonecróticos en el 54% de los animales en el grupo 2 y 46% de los animales del grupo 1, en contraste con la baja incidencia en grupo 3 (20%) y grupo 4 (8%) tratadas con ASCs. El valor medio de osteoclastos fue mayor en el grupo 4 (9,9 osteoclastos por campo a x40 aumentos) y en grupo 3 (8,4 osteoclastos por campo a x40) que en el resto de grupos (7,4 osteoclastos por campo a x40 en grupo 2 y 7,2 osteoclastos por campo a x40 en grupo 1). El análisis de la vascularización mostró un elevado recuento de vasos en grupo 4 (media 2,5); este número descendía en grupo 3 (2,1), grupo 2 (2,3) y grupo 1 (2,2). Sin embargo, el análisis de la remodelación alveolar mostró mayor reabsorción en el grupo 3 (media 3,2) comparado con el resto de grupos (2,6 en grupo 4, 2,8 en grupo 2 y 1,9 en grupo 1). La incompleta cicatrización epitelial resultó más frecuente en el grupo 3 (60%) una semana después de la cirugía. Se hallaron pequeños abscesos en la

submucosa en estrecha relación con comida impactada y restos de sutura; siendo más frecuentes en el grupo 4. Los resultados histológicos se resumieron en la Tabla 6 y la Figura 7.

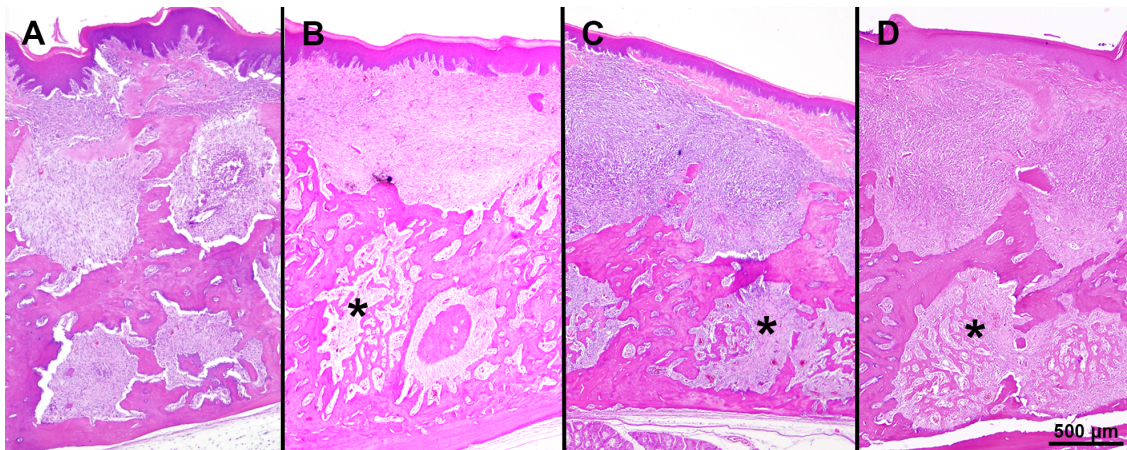


Figura 7: Imágenes histológicas de los alveolos a la semana de las extracciones. Tinción con Hematoxilina-eosina.

A: Animal del grupo 1 del estudio de tratamientos preventivos de BRONJ: remodelación ósea limitada con cresta alveolar alta.

B: Animal del grupo 2: reabsorción crestal parcial y nuevas trabéculas óseas (\*) en la mitad apical del alveolo.

C: Animal del grupo 3: elevado recambio óseo

D: Animal del grupo 4: elevado remodelamiento óseo con formación de múltiples nuevas trabéculas (\*).

Grupo	Osteonecrosis	Osteoclastos/ campo x40	Vasc	Rabsorción ósea	Disrupción mucosa	Infiltrado inflamatorio (Absceso)
1	46%	7.2 (3.0)	2,2 (0.8)	1.9 (0.8)	15%	15%
2	54%	7.4 (3.5)	2.3 (0.6)	2.8 (0.9)	18%	27%
3	20%	8.4 (3.7)	2.1 (0.8)	3.2 (0.7)	60%	13%
4	8%	9.9 (2.7)	2.5 (0.7)	2.6 (0.8)	23%	54%

Tabla 6: Resultados histológicos de cada grupo de tratamiento.

En esta tabla se presentan los porcentajes de animales de cada grupo que mostraron osteonecrosis, disrupción de la mucosa y abscesos. El número de osteoclastos por campo a 40x aumentos, la vascularización (escala 1-5, ver texto) y reabsorción ósea (escala 1-5, ver texto) de cada grupo se presentan como media aritmética (desviación estándar). Vasc –Vascularización

El diseño original en cuatro grupos permitió un análisis de limitada potencia debido al bajo número de animales por grupo. Por ello, comparamos los resultados de los tratamientos con y sin ASCs en los alveolos postextracción en ratas tratadas con ZA (Tabla 7), aumentando así el número de animales por grupo.

Osteonecrosis en el hueso alveolar estaba presente en el 50% de los animales sin tratamiento con ASCs. Este porcentaje descendía a 14% en el grupo de animales tratados con ASCs alogénicas. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa ( $p=0,007$ ). La diferencia en el conteo de osteoclastos entre el grupo de animales tratados con ASCs (9,0 osteoclastos por campo x40) y sin ASCs (7,3 osteoclastos por campo x40) fue también estadísticamente significativa ( $p=0,045$ ). No fue posible estimar diferencias significativas en el análisis de la vascularización (2,2 en el grupo sin tratamiento de ASCs y 2,3 en el grupo con tratamiento de ASCs). La reabsorción ósea fue mayor en el grupo tratado con ASCs (2,9). Cuando

comparamos con los animales no tratados con ASCs, la diferencia observada en remodelación ósea en los alveolos postextracción (2,3) fue estadísticamente significativa ( $p=0,024$ ). Disrupción de la superficie mucosa e infiltrados inflamatorios se encontraron más frecuentemente en especímenes tratados con ASCs (43%), aunque no se hallaron diferencias significativas con el grupo no tratado con ASCs (32%) .

Grupo	Osteonecrosis	Osteoclastos / campo 40x	Vasc.	Reabsorción ósea	Disrupción mucosa	Infiltrado inflamatorio (Absceso)
Tratamiento sin ASCs	50%	7.3 (3.2)	2.2 (0.8)	2.3 (0.9)	17%	21%
Tratamiento con ASCs	14%	9.0 (3.3)	2.3 (0.8)	2.9 (0.8)	43%	32%
Significación estadística	$p=0.007$	$p=0.045$	NS	$p=0.024$	NS	NS

Tabla 7: Hallazgos histológicos tras el reagrupamiento en grupos con y sin tratamiento con ASCs. En esta tabla se presentan los porcentajes de cada grupo mostrando osteonecrosis, disrupción de la mucosa y abscesos. El número de osteoclastos por campo a 40x aumentos, la vascularización (escala 1-5, ver texto) y reabsorción ósea (escala 1-5, ver texto) de cada grupo se presentan como media aritmética (desviación estándar). Vasc – Vascularización. NS – No significancia.

- Resultados de fluorescencia:

Se observaron ASCs una semana después de las extracciones dentales, conglomeradas en los restos del coágulo de PRP, en el grupo 3. Las células también se hallaron a través de todo el alveolo postextracción en grupos 3 y 4, desde la submucosa descendiendo al fondo del alveolo y las nuevas trabéculas óseas (Figura 8). No se localizaron ASCs en la mucosa ni en el interior del hueso alveolar.

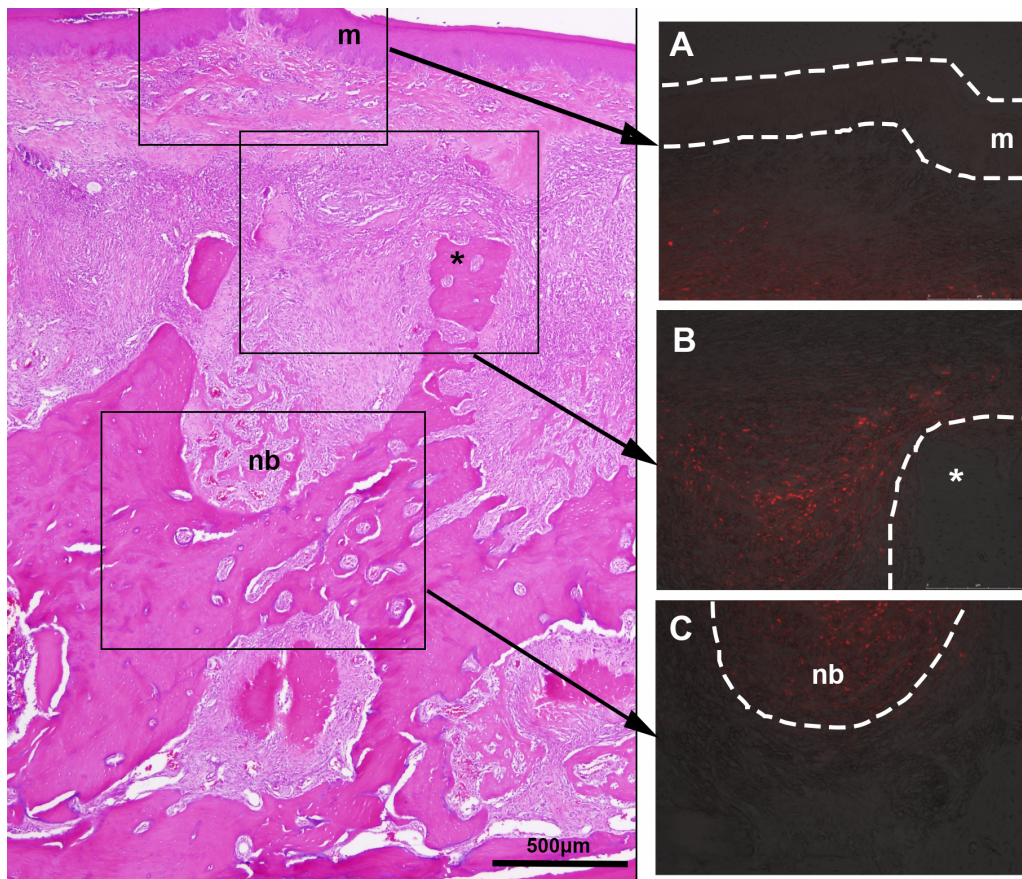


Figura 8: Estudio de fluorescencia en un animal del grupo 3 del estudio de tratamiento preventivos de MRONJ.

A: ASCs marcadas con PKH-26 (fluorescencia roja) localizadas en submucosa (m, mucosa).

B: ASCs localizadas en el interior del alveolo, en toda su extensión (\* hueso crestal).

C: ASCs localizadas entre trabéculas de nuevo hueso (nb).

- Resultados radiográficos

El análisis de las radiografías simples mostró características de BRONJ incluyendo osteoesclerosis, engrosamiento óseo y disrupción de la cortical alveolar (Figura 9 y Tabla 8).

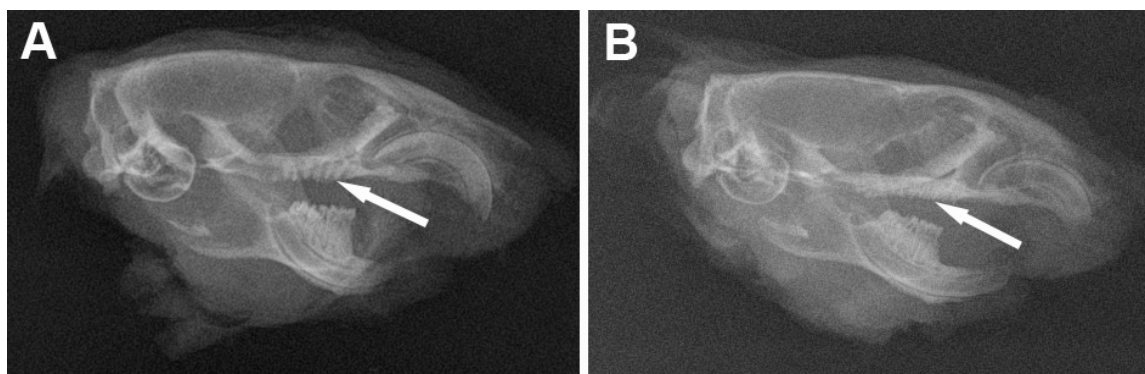


Figura 9: Hallazgos radiográficos: Radiografía simple de las hemicabezas a la semana de las extracciones.

A: Disrupción cortical del reborde alveolar en un animal del grupo 1 (flecha).

B: Engrosamiento del hueso alveolar en un animal del grupo 4 (flecha).

Grupo	Osteoesclerosis	Engrosamiento óseo	Disrupción cortical
1	85%	23%	38%
2	100%	54%	18%
3	87%	47%	20%
4	92%	31%	8%

Tabla 8: Hallazgos radiográficos de cada grupo de tratamiento.

Porcentaje de osteonecrosis, engrosamiento óseo y disrupción cortical en cada grupo de animales.

El análisis de la densidad ósea mostró osteoesclerosis en más de 85% de las ratas en todos los grupos, una consecuencia frecuente del tratamiento con BFs. El engrosamiento óseo fue más frecuente en el grupo 2 (54%) y grupo 3 (47%). Sin embargo, la disrupción cortical en el hueso alveolar maxilar fue mayor en el grupo 1 (38%). No fue posible estimar diferencias significativas

entre los hallazgos radiográficos, tanto en la división original en cuatro grupos como tras el análisis de los grupos con y sin tratamiento de ASCs.





## DISCUSIÓN

El ácido zoledrónico es un aminobisfosfonato de uso intravenoso, con la mayor potencia relativa en este grupo farmacológico (10.000 veces mayor que el Etidronato) (197, 198) y por lo tanto es uno de los BFs más frecuentemente asociados al desarrollo de osteonecrosis. Por estas razones, es uno de los BFs más comúnmente utilizados en modelos animales experimentales (ver Tabla 2).

En la puesta a punto del modelo de osteonecrosis maxilar por ácido zoledrónico en rata, nuestro objetivo fue desarrollar un modelo de lesiones BRONJ administrando únicamente ZA. La frecuencia de la dosis se eligió para maximizar la exposición al medicamento durante el periodo relativamente corto de 9 semanas del experimento (199), con el fin de alcanzar en los animales experimentales una dosis acumulada de ZA mayor que la utilizada en el tratamiento oncológico estándar en humanos (0,05 mg ZA/Kg de peso, mensual), sin toxicidad añadida.

Las principales teorías sobre BRONJ apuntan a la supresión de la remodelación ósea, mediada por el daño a los osteoclastos y que ante un trauma, como una extracción dental, conducirá a una reducción en la reparación ósea. Los resultados de nuestro estudio mostraron un retraso en la formación de nuevo hueso en los animales tratados con ZA en comparación con los controles, especialmente en aquellos tratados con una dosis acumulada mayor (grupo 1 del Modelo de osteonecrosis maxilar). Esto se halla en estrecha relación con el número de osteoclastos que en el grupo 1 (media del conteo en 3 campos a 40x) era menos de la mitad de los hallados en los

controles. Estos hallazgos soportan la afirmación de muchos autores, de que la magnitud de la reducción en el recambio óseo y la probabilidad de BRONJ están en relación con la dosis total administrada y la duración del tratamiento con el bisfosfonato(200).

La reabsorción completa del hueso alveolar y su sustitución por una matriz fibrosa al 7º día de las extracciones dentales, así como la completa formación de nuevo hueso 14º día, son estados de cicatrización consecutivos del hueso alveolar en ratas(192, 196). Hikita et al. observaron un descenso en la reabsorción del hueso alveolar tras un tratamiento de larga duración con bisfosfonatos, al 7º día de una extracción dental(192). En nuestro modelo de osteonecrosis, también encontramos diferencias estadísticamente significativas en la reabsorción ósea entre grupos de tratamiento y controles ( $p= 0.004$ ). El retraso en la cicatrización alveolar inicial parece ser secundario a la disrupción del mecanismo de remodelación ósea, permitiendo la persistencia de hueso defectuoso y necrótico(184).

En el estudio “Obtención de un modelo de osteonecrosis maxilar por ZA en rata” se detectó osteonecrosis (secuestros) en el 80% de los especímenes del grupo, porcentaje conseguido por pocos modelos experimentales con tratamientos con BFs y extracciones dentales (201, 202). Otros autores administraron corticoides u otros fármacos inmunosupresores (52-55, 203) con el objetivo de provocar una acción antirreabsortiva. Estas asociaciones proporcionaron tasas de osteonecrosis más altas, en comparación con las obtenidas en aquellos modelos experimentales que utilizaron exclusivamente tratamiento con ZA y extracciones dentales (Tabla 2). Otros cofactores utilizados en modelos murinos de tratamiento con ZA son la deficiencia de

vitamina D (51), la perforación de un defecto óseo rodeando el alveolo postextracción (204) o una lesión mucosa (6, 36, 37, 203). En nuestro modelo de BRONJ, se muestra el efecto real del ZA en el hueso alveolar, ya que no se administró ningún otro fármaco. Nos encontramos con una ausencia de focos de osteonecrosis en los animales tratados con ZA y sin extracciones dentales. De este modo, se asocia el trauma dental como factor desencadenante en animales tratados, con la probabilidad de desarrollar BRONJ, como se muestra en estudios experimentales (42, 201-203) y clínicos (83, 205, 206). La elevada heterogeneidad de los criterios de BRONJ utilizados entre los distintos modelos animales publicados (la mayoría hacen uso de una definición histológica de necrosis), hace difícil compararlos y complica la evaluación de los tratamientos aplicados. Por lo tanto, consideramos debería desarrollarse un “mínimo de criterios de BRONJ” en animales, que incluyera hallazgos histológicos.

En el primer estudio, en el modelo de osteonecrosis por BRONJ en rata, la vascularización de los alveolos postextracción a los 7 días de las extracciones dentales, mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.044$ ) entre los animales tratados con ZA y los controles. Hallazgos similares fueron observados por otros autores (13, 202, 207) y atribuido a los efectos antiangiogénicos de los BFs (12).

La persistencia de exposición ósea en la cavidad oral durante al menos 8 semanas ha sido reconocido como un criterio diagnóstico establecido acorde con la AAOMS (20), y este concepto se ha extendido a los modelos animales con lesiones BRONJ-like (42, 51, 53, 204, 208). Los estadios de BRONJ sin exposición ósea en humanos están siendo abordados en la actualidad, catalogados como estadio 0, con mayor énfasis en la sintomatología y en los

hallazgos radiográficos de osteonecrosis (209, 210). Aunque las fases de la cicatrización alveolar son similares entre humanos y ratas, éstas ocurren de manera más rápida en roedores, aproximadamente un tercio del tiempo requerido en humanos (211). En nuestro primer experimento, modelo de BRONJ, no observamos exposición ósea a los 7 días de las extracciones dentales en ninguno de los grupos tratados con ZA, probablemente debido a la gran capacidad regenerativa gingival de la rata. Microscópicamente, se evidenció ulceración mucosa en los especímenes con extracciones dentales, pero no fue posible obtener una diferencia estadísticamente significativa en la cicatrización mucosa entre los grupos. Cuando desarrollamos nuestro modelo lesional, en pocos estudios experimentales se había conseguido generar exposición ósea con tratamientos que sólo incluyeran de BFs y extracciones dentales, en grandes mamíferos como minipigs (42) y en un modelo en rata utilizando una dosis muy elevada de Alendronato (1 mg/kg/día durante 3 meses) (202). La disminución transitoria de la cicatrización del alveolo en relación con BFs, sólo durante los 10 primeros días postextracción en ratas, se ha sugerido como causa de la baja tasa de exposición ósea observada en estos animales (212). Algunos estudios apoyan que los BFs pueden causar toxicidad a los queratinocitos, inhibiendo la cicatrización epitelial y podría estar en relación con el desarrollo de osteonecrosis (48). Por lo tanto, parece que una gran dosis acumulada de BFs es necesaria para reproducir lesiones BRONJ en modelos en rata.

Las características histológicas no están incluidas en la definición de BRONJ en humanos por la AAOMS en 2009 ni en su actualización del 2014, la cual se basa en características clínicas, signos radiológicos y síntomas. Pero en

pequeños animales, como los murinos, con difícil valoración de síntomas como el dolor, los hallazgos histológicos y radiográficos son las principales herramientas para definir la osteonecrosis relacionada con los bisfosfonatos aunque no se halle exposición ósea. En el modelo murino de Kang et al(39) hallaron osteonecrosis en el 88% de los animales con enfermedad dental apical. De estos animales, solamente el 33% presentó exposición ósea, sugiriendo que la osteonecrosis precede a la exposición ósea. A pesar de que las características de la cicatrización en murinos podrían ser difíciles de extrapolar a los humanos, los modelos en pequeños animales son los indicados para el estudio de eventos infrecuentes pero graves como BRONJ, con una incidencia del 0,8-12 % en pacientes tratados con bisfosfonatos intravenosos(20). Estos modelos son costo-efectivos, fáciles de manejar y ampliamente utilizados en estudios para probar conceptos (como nuestro modelo de BRONJ), para estudios iniciales de causa-efecto y estudios piloto sobre nuevos métodos de tratamiento. Además, originan menos problemas éticos y logísticos, especialmente para tratamientos de larga duración, como es el caso de BRONJ, que precisa un largo y costoso periodo de administración del fármaco y potencialmente podría causar dolor. Las conocidas desventajas de los modelos en rata son su elevado metabolismo, una cicatrización más rápida que en el humano y la limitación del tamaño en el caso de modelos quirúrgicos. Por lo tanto, consideramos los modelos en rata adecuados para realizar estudios sobre patogénesis y tratamientos iniciales.

En este primer estudio, publicado en 2013 (213), desarrollamos un modelo lesional que nos sirviera de base para el desarrollo de posteriores estudios sobre terapias para prevenir la osteonecrosis asociada a bisfosfonatos. Así

mismo, esperábamos aumentar el conocimiento sobre la patofisiología y presentación histológica de BRONJ, todavía poco conocida. La ausencia de reabsorción ósea, vascularización pobre y un bajo número de osteoclastos, fueron hallazgos a nivel alveolar en las ratas tratadas con altas dosis de ZA, lo que remarca el efecto de los BFs al retrasar la remodelación ósea como importante factor en el desarrollo de BRONJ tras extracciones dentales. Nuestro modelo brinda datos importantes (dosis, vía de administración, duración del tratamiento) sobre cómo desarrollar un modelo ideal de BRONJ en rata. Con nuestros resultados y después de analizar los modelos en roedores publicados previos al nuestro, con sus peculiaridades y resultados conseguidos, esperamos aportar datos útiles para avanzar en la investigación de esta grave patología que es la osteonecrosis asociada a bisfosfonatos.

Con el objetivo de disminuir el riesgo de BRONJ tras manipulaciones traumáticas en cavidad oral incluyendo extracciones dentarias, diversos tratamientos están ganando popularidad entre los cirujanos orales, abarcando desde procedimientos simples como colgajos mucosos, a más sofisticados como aplicaciones de PRP y células madre. En nuestro segundo estudio, modelo de prevención de BRONJ en rata publicado en 2015 (214), mostramos que es posible disminuir la incidencia de BRONJ mediante la adición de ASCs sobre un modelo de alto riesgo de desarrollo de BRONJ, en comparación con otros tratamientos sin ASCs (PRP y colgajo mucoso), con significación estadística. Con el objetivo de no interferir con las propiedades inmunológicas de los tratamientos estudiados (PRP y ASCs) y permitir un mejor análisis de los

resultados sin factores de confusión, no se utilizaron otros fármacos (como corticoides) para aumentar la incidencia de BRONJ.

Algunos autores defienden el uso de colgajos locales, especialmente para casos resistentes, en avanzados estadios de la enfermedad (92, 215) o por razones preventivas (216). Para nuestro modelo de prevención de BRONJ, elegimos un colgajo mucoperióstico como tratamiento estándar local de prevención tras extracciones dentales. Cuando el colgajo fue la única medida aplicada, la incidencia de BRONJ descendió de 80% (tasa de osteonecrosis obtenida en nuestro primer estudio (213)) a 46%, en el presente modelo. Sin embargo, el porcentaje de BRONJ en animales tratados con altas dosis de ZA es demasiado alto como para recomendar el colgajo mucoso como único tratamiento preventivo tras procedimientos dentales invasivos.

El PRP es un producto emergente en la prevención (164) y el tratamiento (160, 217) de BRONJ, y ha sido utilizado en la práctica clínica, de un modo más empírico que basado en evidencias científicas. Las plaquetas secretan numerosos factores de crecimiento y citoquinas que podrían disminuir y acortar la inflamación local inicial, estimular la neoangiogénesis y por lo tanto, promover la cicatrización tisular (218). El coágulo de PRP parece ser también menos favorable al crecimiento bacteriano debido a su pH (218). Las plaquetas liberan casi el 95% de sus factores de crecimiento presintetizados dentro de la primera hora desde su activación y continúan produciendo estas proteínas hasta su senescencia (5-10 días). Por lo tanto, la influencia del PRP sobre la cicatrización ósea, la cual es un proceso lento, parece estar localizada exclusivamente al inicio del proceso y otros tratamientos más duraderos podrían resultar más beneficiosos. Esta observación podría explicar porqué, en

nuestro modelo, el PRP parece no añadir beneficios (sin significación estadística) sobre el colgajo como único tratamiento.

Las ASCs son MSCs obtenidas del tejido adiposo (122) y son capaces de secretar una gran variedad de factores de crecimiento (219) con un impacto significativo en la regeneración tisular (220). El reclutamiento de células de linaje endotelial por MSCs podría potencialmente jugar un interesante papel en la mejora del aporte vascular (221). Un número significativo de MSCs injertadas en la herida pueden originar el aumento del aporte vascular local y mejorar la capacidad de regeneración (113) y subsecuentemente, podrían permitir una mejor osteogénesis del hueso dañado (222). En nuestro estudio de tratamientos preventivos de BRONJ, encontramos que los animales tratados con células madre mostraron una menor tasa de osteonecrosis (14%; Tabla 7) y mayor densidad de osteoclastos ( $p=0,007$  y  $p=0,045$ , respectivamente. Tabla 7). Consecuentemente, la remodelación ósea estaba aumentada en los especímenes tratados con células troncales ( $p=0,024$ ). La presencia de ASCs en toda la extensión del alveolo post-extracción, a distancia del coágulo de PRP aplicado a nivel crestal, es importante, para poder deducir una participación directa de las ASCs en la cicatrización ósea. No se obtuvo significación estadística en el análisis de la vascularización.

Las MSCs también poseen capacidades inmunomoduladoras (223, 224). Se piensa que esta actividad está en gran parte basada en la inhibición de la proliferación de células B/T y de la maduración de células dendríticas (223) y en la secreción de un gran número de citoquinas y factores de crecimiento (221). Las MSC también son capaces de restaurar el desequilibrio inmunológico originado por el tratamiento con ácido zoledrónico (entre células



T-helper y células T-reguladoras), el cual puede alterar la respuesta inflamatoria del alveolo en cicatrización, en animales tratados con bisfosfonato (55, 112). Sin embargo, en nuestro segundo estudio se detectaron infiltrados inflamatorios en todos los grupos, sin estrecha relación con los focos osteonecróticos. No se observaron reacciones adversas contra ASCs y PRP alogénicos. Aunque el uso del PRP autólogo es la forma de utilización más común en humanos, el uso de PRP alogénico en pequeños animales hace posible obtener grandes cantidades de este producto de un pequeño número de donantes (225).

Las ASCs presentan una gran ventaja respecto a las BM-MSCs respecto a su obtención y rendimiento. Ambos tipos de MSCs presentan propiedades similares. Sin embargo, las ASCs se caracterizan por tener una proliferación celular más rápida, una estable duplicación de la población y niveles de senescencia inferiores a las BM-MSCs. Algunos artículos describen menor capacidad osteogénica pero mayor capacidad angiogénica y anti-inflamatoria de las ASCs sobre las BM-MSCs (226). Las ASCs han mostrado supervivencia en ambientes isquémicos y un incremento en la secreción de factores de crecimiento (VEGF, HGF y bFGF) que son necesarios para la angiogénesis en ambientes hipóxicos (227, 228). Este hecho resulta interesante para el tratamiento de osteonecrosis ósea y heridas isquémicas como en BRONJ.

Estudios de investigación básica han encontrado efectos entre el PRP y las MSCs importantes y sinérgicos (166). Tanto el PRP como las MSCs estimulan el reclutamiento de macrófagos y acortan la respuesta inflamatoria aguda, lo que conduce a una pronta progresión hacia la inflamación crónica y la regeneración tisular (229). En nuestro segundo estudio utilizamos un coágulo

de PRP para empaquetar y retener las ASCs trasplantadas en el grupo 3, siendo el PRP un agente osteoconductor que proporciona estabilidad y adhesión a las ASCs. Esta combinación disminuyó la incidencia de BRONJ en comparación con el uso exclusivo del colgajo mucoso e incrementó el recambio óseo. El paradójico elevado porcentaje de disrupción mucosa observado en el análisis histológico del grupo 3 del “estudio de tratamientos preventivos de BRONJ”, podría ser explicado por la ligera dehiscencia mucosa favorecida por el gran volumen del coágulo de PRP-ASCs, aunque el PRP y la submucosa permanecían cubriendo el hueso al séptimo día después de la cirugía oral. El PRP parece disminuir la secreción de VEGF de las ASCs en células cultivadas con PRP (166). Este hecho puede explicar la diferencia en la vascularización ósea entre los grupos 3 y 4 de nuestro segundo estudio animal. En el grupo 4, las ASCs pre-cultivadas con BMP-2 se extendieron directamente sobre los alveolos y se cubrieron con el coágulo de PRP, el cual podría haber tenido una influencia menos directa sobre las ASCs.

Con el objetivo de favorecer las capacidades osteogénicas de las ASCs, introducimos BMP-2, ya que esta proteína se ha descrito como potenciadora osteogénica (120) y el PRP ha sido descrito como potenciador de la diferenciación osteoblástica en la presencia de BMPs (230). Con esta combinación, logramos la incidencia más baja de BRONJ. Este grupo también tenía el conteo de osteoclastos más alto y mayor vascularización una semana tras las extracciones dentales, pero el recambio o reabsorción ósea fue mayor en el grupo con ASCs sin BMP-2, aunque estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos. Se precisarán más estudios preclínicos y

clínicos para elucidar todas las implicaciones del PRP y BMP-2 en la regeneración ósea con ASCs.

Nos decidimos por una aplicación local de las células troncales mesenquimales (113) y no una infusión intravenosa (55, 112). Esta aplicación permite que los beneficios de las ASCs se concentren en el área de interés. El estudio de fluorescencia reveló ASCs en el interior del tejido fibroso y el hueso remodelado en los alveolos a los siete días de su aplicación, sugiriendo que las ASCs son capaces de sobrevivir y dispersarse en el interior del tejido de cicatrización en ratas tratadas con ZA, a los siete días de las extracciones dentales.

Los modelos murinos tienen la desventaja de un rápido metabolismo y mejor cicatrización que los humanos, proporcionando resultados que pueden hacer difícil la extrapolación al humano. Los modelos en pequeños animales son los indicados para el estudio de nuevas terapias por su costo-efectividad, fácil manejo y menos problemas éticos y logísticos, especialmente para tratamientos de larga duración, como es el caso de BRONJ. No se obtuvo exposición ósea en nuestro segundo estudio. Esta situación fue favorecida por los diferentes tratamientos aplicados para la prevención de BRONJ y por el hecho de que no se administró ningún otro fármaco que pudiera favorecer el desarrollo de osteonecrosis (como corticoides u otros fármacos inmunosupresores), con la excepción del ZA. Incluso con las limitaciones de este estudio, osteonecrosis histológica debería ser considerado un hallazgo relevante en animales con elevado metabolismo y elevado recambio óseo. La osteonecrosis histológica sin exposición clínica parece ser la fase inicial de esta patología, aunque las características histológicas no están incluidas en la

definición de BRONJ en humanos de la AAOMS (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons). Por otro lado, la teoría sobre BRONJ “inside-outside”, se basa en la inhibición osteoclástica y la supresión del recambio por BFs, de forma que la necrosis del tejido óseo que no se repara de los microdaños de las fuerzas masticatorias, presenta las exposiciones óseas como un evento tardío. En varios modelos animales de BRONJ se han descrito osteonecrosis histológica en la mayoría de los especímenes, pero solo una minoría presentaba exposición ósea (sin cubierta epitelial) (36, 39). Otro estudio histológico en humanos concluyó que la necrosis ósea precede a la instauración de la clínica y es responsable del proceso inflamatorio asociado(231). Todos estos hallazgos sugieren que la exposición ósea podría no ser un prerrequisito para la necrosis ósea.

El efecto preventivo de las ASCs mostrado en este estudio, aporta nuevos datos para avanzar en la investigación de potenciales tratamientos de esta grave patología en humanos.

## CONCLUSIONES

1. Nuestro modelo de BRONJ tras administración crónica de ácido zoledrónico y extracciones dentarias en rata, se consolida como modelo válido y repetible para realizar estudios terapéuticos.
2. Los tratamientos basados en ASCs aplicados localmente en los alveolos postextracción sobre nuestro modelo de BRONJ, previenen el desarrollo de osteonecrosis, proporcionando mayor eficacia que el colgajo mucoso con o sin PRP.
3. El PRP es un vehículo bioactivo, factible para la aplicación de las ASCs en alveolos postextracción.
4. Sobre nuestro modelo, la prediferenciación osteogénica de las ASC por co-cultivo con BMP2 no mejora los resultados frente a las mismas células no prediferenciadas.
5. En este estudio se demuestra la presencia de ASCs en toda la extensión del alveolo postextracción a los 7 días de su aplicación.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Lewiecki EM. Safety of Long-Term Bisphosphonate Therapy for the Management of Osteoporosis. *Drugs*. 2011;71(6).
2. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(12):2692-6.
3. Ponte FSD. Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw: A Multidisciplinary Approach. Verlag Italia: Springer; 2012.
4. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2-19.
5. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*. 2000;113 ( Pt 3):377-81.
6. Yamashita J, Koi K, Yang D-Y, McCauley LK. Effect of Zoledronate on Oral Wound Healing in Rats. *Clin Cancer Res*. 2011;17(6):1405-14.
7. Kimachi K, Kajiya H, Nakayama S, Ikebe T, Okabe K. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2011;383(3):297-308.
8. Tseng HC, Kanayama K, Kaur K, Park SH, Park S, Kozłowska A, et al. Bisphosphonate-induced differential modulation of immune cell function in gingiva and bone marrow in vivo: Role in osteoclast-mediated NK cell activation. *Oncotarget*. 2015;6(24):20002-25.
9. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates: Current Status. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20):6222s-30s.
10. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*. 2011;49(1):50-5.
11. Reid IR, Cornish J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(2):90-6.
12. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302(3):1055-61.
13. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits

oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(2):165-75.

14. Soki FN, Li X, Berry J, Koh A, Sinder BP, Qian X, et al. The effects of zoledronic acid in the bone and vasculature support of hematopoietic stem cell niches. *J Cell Biochem.* 2013;114(1):67-78.

15. Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9(8):2893-7.

16. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res.* 2000;60(11):2949-54.

17. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws--2009 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5, Supplement 1):2-12.

18. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(10):1938-56.

19. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol.* 2006;7(6):508-14.

20. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws-2009 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5):2-12.

21. Rosella D, Papi P, Giardino R, Cicalini E, Piccoli L, Pompa G. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry.* 2016;6(2):97-104.

22. Fedele S, Porter SR, D'Aiuto F, Aljohani S, Vescovi P, Manfredi M, et al. Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *Am J Med.* 2010;123(11):1060-4.
23. Bedogni A, Fusco V, Agrillo A, Campisi G. Learning from experience. Proposal of a refined definition and staging system for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Dis.* 2012;18(6):621-3.
24. Schiodt M, Reibel J, Oturai P, Kofod T. Comparison of nonexposed and exposed bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: a retrospective analysis from the Copenhagen cohort and a proposal for an updated classification system. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology.* 2014;117(2):204-13.
25. Fedele S, Bedogni G, Scoletta M, Favia G, Colella G, Agrillo A, et al. Up to a quarter of patients with osteonecrosis of the jaw associated with antiresorptive agents remain undiagnosed. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015;53(1):13-7.
26. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.* 2015;30(1):3-23.
27. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(9):1115-7.
28. Wang J, Goodger NM, Pogrel MA. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(9):1104-7.
29. Carter GG, Goss ANAN, Doecke CC. Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaw: a possible association. *The Medical journal of Australia.* 2005;182(8):413--5.
30. Fliefel R, Troltzsch M, Kuhnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(5):568-85.
31. Lombard T, Neirinckx V, Rogister B, Gilon Y, Wislet S. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. *Stem Cells International.* 2016;2016:8768162.



32. Hoefert S, Schmitz I, Tannapfel A, Eufinger H. Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. *Clin Oral Investig*. 2010;14(3):271-84.
33. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(4):219-27.
34. Ripamonti CI, Maniezzo M, Campa T, Fagnoni E, Brunelli C, Saibene G, et al. Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumour patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. *Ann Oncol*. 2009;20(1):137-45.
35. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res*. 2008;23(6):826-36.
36. Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1871-82.
37. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams A, Jorgensen M, et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res*. 2012;27(10):2130-43.
38. López-Jornet Pa, Camacho-Alonso F, Martínez-Canovas A, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V. Perioperative Antibiotic Regimen in Rats Treated With Pamidronate Plus Dexamethasone and Subjected to Dental Extraction: A Study of the Changes in the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(10):2488-93.
39. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res*. 2013;28(7):1631-40.
40. de Molon RS, Cheong S, Bezouglaia O, Dry SM, Pirih F, Cirelli JA, et al. Spontaneous osteonecrosis of the jaws in the maxilla of mice on antiresorptive treatment: a novel ONJ mouse model. *Bone*. 2014;68:11-9.

41. Song M, Alshaikh A, Kim T, Kim S, Dang M, Mehrazarin S, et al. Preexisting Periapical Inflammatory Condition Exacerbates Tooth Extraction-induced Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw Lesions in Mice. *J Endod.* 2016;42(11):1641-6.
42. Pautke C, Kreutzer K, Weitz J, Knäuper M, Mönzel D, Wexel G, et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large animal model. *Bone.* 2012(0).
43. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(4):767-75.
44. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional: Elsevier; 2015.
45. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res.* 2002;62(22):6538-44.
46. Vincenzi B, Napolitano A, Zoccoli A, Iuliani M, Pantano F, Papapietro N, et al. Serum VEGF levels as predictive marker of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Hematol Oncol.* 2012;5:56.
47. Reid I, Bolland M, Grey A. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* 2007;41(3):318-20.
48. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, et al. Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(5):839-47.
49. FS DP, Catalfamo L, Micali G, Runci M, Cutroneo G, Vermiglio G, et al. Effect of bisphosphonates on the mandibular bone and gingival epithelium of rats without tooth extraction. *Exp Ther Med.* 2016;11(5):1678-84.
50. Galluzzo S, Santini D, Vincenzi B, Caccamo N, Meraviglia F, Salerno A, et al. Immunomodulating role of bisphosphonates on human gamma delta T cells: an intriguing and promising aspect of their antitumour activity. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11(7):941-54.
51. Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res.* 2010;25(6):1337-49.

52. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* 2009;45(2):164-72.
53. Bi Y, Gao Y, Ehiriou D, Cao C, Kikuri T, Le A, et al. Bisphosphonates Cause Osteonecrosis of the Jaw-Like Disease in Mice. *Am J Pathol.* 2010;177(1):280-90.
54. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague–Dawley rats. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(9):697-702.
55. Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1668-79.
56. Cankaya AB, Erdem MA, Isler SC, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, et al. Use of Cone-Beam Computerized Tomography for Evaluation of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws in an Experimental Rat Model. *Int J Med Sci.* 2011;8(8):667-72.
57. King A, Umland E. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphosphonates. *Pharmacotherapy.* 2008(0277-0008 (Print)).
58. Cheung A, Seeman E. Teriparatide Therapy for Alendronate-Associated Osteonecrosis of the Jaw. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2473-4.
59. Lo JC, O'Ryan FS, Gordon NP, Yang J, Hui RL, Martin D, et al. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(2):243-53.
60. Grbic JT, Black DM, Lyles KW, Reid DM, Orwoll E, McClung M, et al. The incidence of osteonecrosis of the jaw in patients receiving 5 milligrams of zoledronic acid: data from the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly clinical trials program. *J Am Dent Assoc.* 2010;141(11):1365-70.
61. Black DM, Reid IR, Boonen S, Bucci-Rechtweg C, Cauley JA, Cosman F, et al. The Effect of 3 Versus 6 Years of Zoledronic Acid Treatment of

Osteoporosis: A Randomized Extension to the HORIZON-Pivotal Fracture Trial (PFT). *J Bone Miner Res.* 2012;27(2):243-54.

62. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2011;29(9):1125-32.

63. Lo JC, O'Ryan FS, Gordon NP, Yang J, Hui RL, Martin D, et al. Prevalence of Osteonecrosis of the Jaw in Patients With Oral Bisphosphonate Exposure. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;In Press, Corrected Proof.

64. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8580-7.

65. Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, Swenson KK, Rockwell L, et al. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Periodontol.* 2014;85(2):226-33.

66. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1341-7.

67. Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, Katodritou E, Triaridis S, Andreadis CG, et al. Longitudinal Cohort Study of Risk Factors in Cancer Patients of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *J Clin Oncol.* 2009;27(32):5356-62.

68. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis Z, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case-control study of risk factors in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2008;26(28):4634-8.

69. Wickham N, Crawford A, Carney AS, Goss AN. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the external auditory canal. *J Laryngol Otol.* 2013;127 Suppl 2:S51-3.

70. Kharazmi M, Hallberg P, Persson U, Warfvinge G. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the auditory canal. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2013;51(8):e285-7.

71. Polizzotto MN, Cousins V, Schwarer AP. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the auditory canal. *Br J Haematol.* 2006;132(1):114.
72. Yamazaki T, Yamori M, Ishizaki T, Asai K, Goto K, Takahashi K, et al. Increased incidence of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients treated with bisphosphonates: a cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(11):1397-403.
73. Tsao C, Darby I, Ebeling PR, Walsh K, O'Brien-Simpson N, Reynolds E, et al. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(8):1360-6.
74. Moeini M, Moeini M, Lotfizadeh N, Alavi M. Radiography Finding in the Jaws in Children Taking Bisphosphonate. *Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology.* 2013;3(3):114-8.
75. Brown J, Ramalingam L, Zacharin M. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: does it occur in children? *Clin Endocrinol.* 2008;Oxf(68):863.
76. Guarneri V, Miles D, Robert N, Dieras V, Glaspy J, Smith I, et al. Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(1):181-8.
77. Katz J, Gong Y, Salmasinia D, Hou W, Burkley B, Ferreira P, et al. Genetic polymorphisms and other risk factors associated with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40(6):605-11.
78. Nicoletti P, Cartsos VM, Palaska PK, Shen Y, Floratos A, Zavras AI. Genomewide pharmacogenetics of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: the role of RBMS3. *Oncologist.* 2012;17(2):279-87.
79. Marini F, Tonelli P, Cavalli L, Cavalli T, Masi L, Falchetti A, et al. Pharmacogenetics of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Frontiers in bioscience (Elite edition).* 2011;3:364-70.
80. Yamashita J, McCauley L. Antiresorptives and osteonecrosis of the jaw. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12:233-47.
81. Fehm T, Beck V, Banys M, al e. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw (ONJ): Incidence and risk factors in patients with breast cancer and gynecological malignancies. *Gynecol Oncol.* 2009;112:605-9.

82. Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, Jacobsen PL, Kalmar JR, Koka S, et al. Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc.* 2011;142(11):1243-51.
83. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1567-75.
84. Dal Pra KJ, Lemos CA, Okamoto R, Soubhia AM, Pellizzer EP. Efficacy of the C-terminal telopeptide test in predicting the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016.
85. de-Freitas N-R, Lima L-B, de-Moura M-B, Veloso-Guedes C-d-C-F, Simamoto-Júnior P-C, de-Magalhães D. Bisphosphonate treatment and dental implants: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(5):e644-e51.
86. Walter C, Al-Nawas B, Wolff T, Schiegnitz E, Grötz KA. Dental implants in patients treated with antiresorptive medication – a systematic literature review. *International Journal of Implant Dentistry.* 2016;2(1):9.
87. Damm DD, Jones DM. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a potential alternative to drug holidays. *Gen Dent.* 2013;61(5):33-8.
88. Hasegawa T, Ri S, Umeda M, Komatsubara H, Kobayashi M, Shigeta T, et al. The observational study of delayed wound healing after tooth extraction in patients receiving oral bisphosphonate therapy. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013;41(7):558-63.
89. Ferlito S, Puzzo S, Liardo C. Preventive Protocol for Tooth Extractions in Patients Treated With Zoledronate: A Case Series. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;In Press, Corrected Proof.
90. Rollason V, Laverriere A, MacDonald LC, Walsh T, Tramer MR, Vogt-Ferrier NB. Interventions for treating bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *The Cochrane database of systematic reviews.* 2016;2:Cd008455.

91. Rugani P, Acham S, Kirnbauer B, Truschnegg A, Obermayer-Pietsch B, Jakse N. Stage-related treatment concept of medication-related osteonecrosis of the jaw—a case series. *Clin Oral Investig*. 2015;19(6):1329-38.
92. Voss PJ, Joshi Oshero J, Kovalova-Muller A, Veigel Merino EA, Sauerbier S, Al-Jamali J, et al. Surgical treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: technical report and follow up of 21 patients. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(8):719-25.
93. Otto S, Ristow O, Pache C, Troeltzsch M, Fliefel R, Ehrenfeld M, et al. Fluorescence-guided surgery for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw: A prospective cohort study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(8):1073-80.
94. Pautke C, Bauer F, Otto S, Tischer T, Steiner T, Weitz J, et al. Fluorescence-guided bone resection in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: first clinical results of a prospective pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(1):84-91.
95. Yoshiga D, Sasaguri M, Matsuo K, Kokuryou S, Habu M, Oda M, et al. Intraoperative detection of viable bone with fluorescence imaging using Visually Enhanced Lesion Scope in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: clinical and pathological evaluation. *Osteoporos Int*. 2015;26(7):1997-2006.
96. Assaf AT, Zrnc TA, Riecke B, Wikner J, Zustin J, Friedrich RE, et al. Intraoperative efficiency of fluorescence imaging by Visually Enhanced Lesion Scope (VELscope) in patients with bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42(5):e157-64.
97. Ristow O, Otto S, Geiss C, Kehl V, Berger M, Troeltzsch M, et al. Comparison of auto-fluorescence and tetracycline fluorescence for guided bone surgery of medication-related osteonecrosis of the jaw: a randomized controlled feasibility study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016.
98. Ristow O, Pautke C. Auto-fluorescence of the bone and its use for delineation of bone necrosis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(11):1391-3.
99. Carlson ER, Basile JD. The role of surgical resection in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):85-95.

100. Seth R, Futran ND, Alam DS, Knott PD. Outcomes of vascularized bone graft reconstruction of the mandible in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Laryngoscope*. 2010;120(11):2165-71.
101. Sacco R, Sacco G, Acocella A, Sale S, Sacco N, Baldoni E. A systematic review of microsurgical reconstruction of the jaws using vascularized fibula flap technique in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2011;19(4):293-300.
102. Vercruysse H, Jr., Backer T, Mommaerts MY. Outcomes of osseous free flap reconstruction in stage III bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: systematic review and a new case series. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42(5):377-86.
103. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
104. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
105. Lombard T, Neirinckx V, Rogister B, Gilon Y, Wislet S. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. *Stem cells international*. 2016;2016:8768162.
106. Mokarram N, Bellamkonda RV. A perspective on immunomodulation and tissue repair. *Ann Biomed Eng*. 2014;42(2):338-51.
107. Tabera S, Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Sanchez-Abarca LI, Blanco B, Lopez A, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008;93(9):1301-9.
108. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 2007;92(7):881-8.
109. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009;57(11):1192-203.



110. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):386-98.
111. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1009-16.
112. Li Y, Xu J, Mao L, Liu Y, Gao R, Zheng Z, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for bisphosphonate-related jaw osteonecrosis in Swine. *Stem cells and development*. 2013;22(14):2047-56.
113. Cella L, Oppici A, Arbasi MC, Moretto M, Piepoli M, Vallisa D, et al. Autologous bone marrow stem cell intralesional transplantation repairing bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. *Head Face Med*. 2011;7(1):16.
114. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009;113(26):6576-83.
115. Zimmermann CE, Gierloff M, Hedderich J, Acil Y, Wiltfang J, Terheyden H. Survival of transplanted rat bone marrow-derived osteogenic stem cells in vivo. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(7-8):1147-56.
116. Neirinckx V, Cantinieaux D, Coste C, Rogister B, Franzen R, Wislet-Gendebien S. Concise review: Spinal cord injuries: how could adult mesenchymal and neural crest stem cells take up the challenge? *Stem Cells*. 2014;32(4):829-43.
117. Konala VBR, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 2016;18(1):13-24.
118. Ogata K, Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Sugimura Y, Hibi H, et al. Evaluation of the therapeutic effects of conditioned media from mesenchymal stem cells in a rat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like model. *Bone*. 2015;74:95-105.
119. Gonzalez-Garcia M, Rodriguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodriguez-Gonzalez MA, Onate-Sanchez R, et al. Cell therapy in

bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg.* 2013;24(3):e226-8.

120. Cowan CM, Aalami OO, Shi YY, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover. *Tissue Eng.* 2005;11(3-4):645-58.

121. Zhu X, Shi W, Tai W, Liu F. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2012;350(2):277-87.

122. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.

123. Toyserkani NM, Christensen ML, Sheikh SP, Sorensen JA. Adipose-Derived Stem Cells: New Treatment for Wound Healing? *Ann Plast Surg.* 2014.

124. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen YD, Hitt DC, Cooper LF, et al. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng.* 2004;10(3-4):371-80.

125. Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J, et al. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials.* 2007;28(36):5477-86.

126. Lopez MJ, McIntosh KR, Spencer ND, Borneman JN, Horswell R, Anderson P, et al. Acceleration of spinal fusion using syngeneic and allogeneic adult adipose derived stem cells in a rat model. *J Orthop Res.* 2009;27(3):366-73.

127. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 2004;22(5):560-7.

128. Levi B, James AW, Nelson ER, Hu S, Sun N, Peng M, et al. Studies in adipose-derived stromal cells: migration and participation in repair of cranial injury after systemic injection. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(3):1130-40.

129. Levi B, James AW, Nelson ER, Vistnes D, Wu B, Lee M, et al. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One.* 2010;5(6):e11177.

130. Lee AS, Xu D, Plews JR, Nguyen PK, Nag D, Lyons JK, et al. Preclinical derivation and imaging of autologously transplanted canine induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32697-704.
131. Wilson SM, Goldwasser MS, Clark SG, Monaco E, Bionaz M, Hurley WL, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells enhance healing of mandibular defects in the ramus of swine. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70(3):e193-203.
132. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng*. 2007;13(3):619-27.
133. Hao W, Hu YY, Wei YY, Pang L, Lv R, Bai JP, et al. Collagen I gel can facilitate homogenous bone formation of adipose-derived stem cells in PLGA-beta-TCP scaffold. *Cells Tissues Organs*. 2008;187(2):89-102.
134. Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant RT, et al. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(3):857-63.
135. Di Bella C, Farlie P, Penington AJ. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue engineering Part A*. 2008;14(4):483-90.
136. Lin Y, Wang T, Wu L, Jing W, Chen X, Li Z, et al. Ectopic and in situ bone formation of adipose tissue-derived stromal cells in biphasic calcium phosphate nanocomposite. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2007;81(4):900-10.
137. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, et al. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg*. 2006;56(5):543-8.
138. Chen Q, Yang Z, Sun S, Huang H, Sun X, Wang Z, et al. Adipose-derived stem cells modified genetically in vivo promote reconstruction of bone defects. *Cytotherapy*. 2010;12(6):831-40.
139. Lee SJ, Kang SW, Do HJ, Han I, Shin DA, Kim JH, et al. Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2010;31(21):5652-9.

140. Sheyn D, Kallai I, Tawackoli W, Cohn Yakubovich D, Oh A, Su S, et al. Gene-modified adult stem cells regenerate vertebral bone defect in a rat model. *Mol Pharm.* 2011;8(5):1592-601.
141. Yang M, Ma QJ, Dang GT, Ma K, Chen P, Zhou CY. In vitro and in vivo induction of bone formation based on ex vivo gene therapy using rat adipose-derived adult stem cells expressing BMP-7. *Cytotherapy.* 2005;7(3):273-81.
142. Zuk P. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells.* 2013;2013:35.
143. Chou YF, Zuk PA, Chang TL, Benhaim P, Wu BM. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 1. BMP2-treated adipose-derived stem cells do not improve repair of segmental femoral defects. *Connect Tissue Res.* 2011;52(2):109-18.
144. Zuk P, Chou YF, Mussano F, Benhaim P, Wu BM. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res.* 2011;52(2):119-32.
145. Keibl C, Fugl A, Zanoni G, Tangl S, Wolbank S, Redl H, et al. Human adipose derived stem cells reduce callus volume upon BMP-2 administration in bone regeneration. *Injury.* 2011;42(8):814-20.
146. Smith DM, Cooper GM, Afifi AM, Mooney MP, Cray J, Rubin JP, et al. Regenerative surgery in cranioplasty revisited: the role of adipose-derived stem cells and BMP-2. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128(5):1053-60.
147. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332(2):370-9.
148. Reichenberger MA, Mueller W, Schafer A, Heimer S, Leimer U, Lass U, et al. Fibrin-embedded adipose derived stem cells enhance skin flap survival. *Stem cell reviews.* 2012;8(3):844-53.
149. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3375-82.
150. Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Transplant.* 2011;20(2):205-16.

151. Froehlich H, Gulati R, Boilson B, Witt T, Harbuzariu A, Kleppe L, et al. Carotid repair using autologous adipose-derived endothelial cells. *Stroke*. 2009;40(5):1886-91.
152. Arora NS, Ramanayake T, Ren Y-F, Romanos GE. Platelet-Rich Plasma: A Literature Review. *Implant Dent*. 2009;18(4):303-10.
153. Lopez-Jornet P, Sanchez Perez A, Amaral Mendes R, Tobias A. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Is autologous platelet concentrate application effective for prevention and treatment? A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(8):1067-72.
154. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67.
155. Longo F, Guida A, Aversa C, Pavone E, Di Costanzo G, Ramaglia L, et al. Platelet Rich Plasma in the Treatment of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: Personal Experience and Review of the Literature. *International journal of dentistry*. 2014;2014:298945.
156. Kim JW, Kim SJ, Kim MR. Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin for the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a prospective feasibility study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52(9):854-9.
157. Everts PA, van Zundert A, Schonberger JP, Devilee RJ, Knappe JT. What do we use: platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel? *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008;85(4):1135-6.
158. Curi MM, Saraceni Issa Cossolin G, Koga DH, Araújo SR, Feher O, dos Santos MO, et al. Treatment of Avascular Osteonecrosis of the Mandible in Cancer Patients With a History of Bisphosphonate Therapy by Combining Bone Resection and Autologous Platelet-Rich Plasma: Report of 3 Cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(2):349-55.
159. Adornato MC, Morcos I, Rozanski J. The treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. *The Journal of the American Dental Association*. 138(7):971-7.
160. Bocanegra-Pérez S, Vicente-Barrero M, Knezevic M, Castellano-Navarro JM, Rodríguez-Bocanegra E, Rodríguez-Millares J, et al. Use of platelet-rich

plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012(0).

161. Martins MAT, Martins MD, Lascalea CA, Curi MM, Migliorati CA, Tenis CA, et al. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: A preliminary study. *Oral Oncol*. 2012;48(1):79-84.

162. Longo F, Guida A, Aversa C, Pavone E, Di Costanzo G, Ramaglia L, et al. Platelet rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: personal experience and review of the literature. *International journal of dentistry*. 2014;2014:298945.

163. Mathias Duarte LF, dos Reis HB, Tucci R, Dib LL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: analysis of a case series at a dental school. *Spec Care Dentist*. 2014;34(2):77-83.

164. Scoletta M, Arduino PG, Pol R, Arata V, Silvestri S, Chiecchio A, et al. Initial experience on the outcome of teeth extractions in intravenous bisphosphonate-treated patients: a cautionary report. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(2):456-62.

165. Asaka T, Ohga N, Yamazaki Y, Sato J, Satoh C, Kitagawa Y. Platelet-rich fibrin may reduce the risk of delayed recovery in tooth-extracted patients undergoing oral bisphosphonate therapy: a trial study. *Clin Oral Investig*. 2016.

166. Van Pham P, Bui KH, Ngo DQ, Vu NB, Truong NH, Phan NL, et al. Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(4):91.

167. Pak J. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain physician*. 2012;15(1):75-85.

168. Tajima S, Tobita M, Orbay H, Hyakusoku H, Mizuno H. Direct and indirect effects on bone regeneration of a combination of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma. *Tissue engineering Part A*. 2014.

169. Park JH, Kim JW, Kim SJ. Does the Addition of Bone Morphogenetic Protein 2 to Platelet-Rich Fibrin Improve Healing After Treatment for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw? *J Oral Maxillofac Surg*. 2016.

170. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res*. 2014;93(4):335-45.
171. Cicciu M, Herford AS, Juodzbals G, Stoffella E. Recombinant human bone morphogenetic protein type 2 application for a possible treatment of bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg*. 2012;23(3):784-8.
172. Bennett MH, Feldmeier J, Hampson NB, Smee R, Milross C. Hyperbaric oxygen therapy for late radiation tissue injury. The Cochrane database of systematic reviews. 2016;4:Cd005005.
173. Lima AL, Oliveira PR, Carvalho VC, Cimerman S, Savio E. Recommendations for the treatment of osteomyelitis. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(5):526-34.
174. Freiburger JJ. Utility of hyperbaric oxygen in treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):96-106.
175. Boykin JV, Jr., Baylis C. Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study. *Advances in skin & wound care*. 2007;20(7):382-8.
176. Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, McGraw T, Suliman HB, Kraft KH, Stolp BW, et al. What is the role of hyperbaric oxygen in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a randomized controlled trial of hyperbaric oxygen as an adjunct to surgery and antibiotics. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70(7):1573-83.
177. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O<sub>3</sub>) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol*. 2011;47(3):185-90.
178. Ripamonti CI, Maniezzo M, Boldini S, Pessi MA, Mariani L, Cislighi E. Efficacy and tolerability of medical ozone gas insufflations in patients with osteonecrosis of the jaw treated with bisphosphonates—Preliminary data(): Medical ozone gas insufflation in treating ONJ lesions. *Journal of Bone Oncology*. 2012;1(3):81-7.

179. Agrillo A, Sassano P, Rinna C, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in extractive surgery on patients treated with bisphosphonates. *J Craniofac Surg*. 2007;18(5):1068-70.
180. Petrucci MT, Gallucci C, Agrillo A, Mustazza MC, Foa R. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2007;92(9):1289-90.
181. Scoletta M, Arduino PG, Reggio L, Dalmaso P, Mozzati M. Effect of low-level laser irradiation on bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: preliminary results of a prospective study. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(2):179-84.
182. Romeo U, Galanakis A, Marias C, Vecchio AD, Tenore G, Palaia G, et al. Observation of pain control in patients with bisphosphonate-induced osteonecrosis using low level laser therapy: preliminary results. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(7):447-52.
183. Vescovi P, Meleti M, Merigo E, Manfredi M, Fornaini C, Guidotti R, et al. Case series of 589 tooth extractions in patients under bisphosphonates therapy. Proposal of a clinical protocol supported by Nd: YAG low-level laser therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(4):e680-e5.
184. Subramanian G, Cohen HV, Quek SYP. A model for the pathogenesis of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw and teriparatide's potential role in its resolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2011;In Press, Corrected Proof.
185. Harper RP, Fung E. Resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: possible application for intermittent low-dose parathyroid hormone [rhPTH(1-34)]. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(3):573-80.
186. Lau AN, Adachi JD. Resolution of osteonecrosis of the jaw after teriparatide [recombinant human PTH-(1-34)] therapy. *J Rheumatol*. 2009;36(8):1835-7.
187. Lee JJ, Cheng SJ, Jeng JH, Chiang CP, Lau HP, Kok SH. Successful treatment of advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible with adjunctive teriparatide therapy. *Head Neck*. 2011;33(9):1366-71.
188. Narongroeknawin P, Danila MI, Humphreys LG, Jr., Barasch A, Curtis JR. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw, with healing after



teriparatide: a review of the literature and a case report. *Spec Care Dentist*. 2010;30(2):77-82.

189. Ohbayashi Y, Miyake M, Sawai F, Minami Y, Iwasaki A, Matsui Y. Adjunct teriparatide therapy with monitoring of bone turnover markers and bone scintigraphy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2013;115(4):e31-7.

190. Khan AA, Morrison A, Kendler DL, Rizzoli R, Hanley DA, Felsenberg D, et al. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International Recommendations for Management From the International Task Force on ONJ. *J Clin Densitom*. 2016.

191. Epstein MS, Wicknick FW, Epstein JB, Berenson JR, Gorsky M. Management of bisphosphonate-associated osteonecrosis: pentoxifylline and tocopherol in addition to antimicrobial therapy. An initial case series. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(5):593-6.

192. Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab*. 2009.

193. Huja SS, Fernandez SA, Phillips C, Li Y. Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Arch Oral Biol*. 2009;54(9):851-6.

194. Huja SS, Mason A, Fenell CE, Mo X, Hueni S, D'Atri AM, et al. Effects of Short-Term Zoledronic Acid Treatment on Bone Remodeling and Healing at Surgical Sites in the Maxilla and Mandible of Aged Dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(2):418-27.

195. Basi DL, Hughes PJ, Thumbigere-Math V, Sabino Ma, Mariash A, Lunos SA, et al. Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Alveolar Extraction Sockets of Zoledronic Acid-Treated Rats. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2011;69(11):2698-707.

196. Hsieh YD, Devlin H, Roberts C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. *Arch Oral Biol*. 1994;39(5):425-8.

197. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 2008;83(9):1032-45.

198. Dodson TB. Intravenous Bisphosphonate Therapy and Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5, Supplement 1):44-52.
199. Senel FC, Duman MK, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2010;In Press, Corrected Proof.
200. Chapurlat RD, Delmas PD. Drug Insight: bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Nat Clin Pract End Met.* 2006;2(4):211-9.
201. Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: A study in Wistar rats. *Head Neck.* 2011;33(2):199-207.
202. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(1):65-73.
203. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med.* 2012;no-no.
204. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(5):390-6.
205. Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI. Zoledronate, Smoking, and Obesity Are Strong Risk Factors for Osteonecrosis of the Jaw: A Case-Control Study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(4):625-31.
206. Barasch A, Cunha-Cruz J, Curro FA, Hujoel P, Sung AH, Vena D, et al. Risk Factors for Osteonecrosis of the Jaws: a Case-Control Study from the CONDOR Dental PBRN. *J Dent Res.* 2011;90(4):439-44.
207. Wehrhan F, Stockmann P, Nkenke E, Schlegel KA, Guentsch A, Wehrhan T, et al. Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2011;In Press, Corrected Proof.

208. Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM, et al. Development of a Rat Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). *J Oral Implantol*. 2011.
209. Patel S, Choyee S, Uyanne J, Nguyen AL, Lee P, Sedghizadeh PP, et al. Non-exposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a critical assessment of current definition, staging, and treatment guidelines. *Oral Dis*. 2012;18(7):625-32.
210. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015;72(10):1938-56.
211. Okamoto T, de Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba*. 1973;2(2):153-69.
212. Aguirre J, Altman M, Vanegas S, Franz S, Bassit A, Wronski T. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis*. 2010.
213. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, Garcia-Arranz M, Yebenes L, Burgueno M. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42(6):744-50.
214. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, Georgiev-Hristov T, Ruiz Bravo-Burguillos E, Abarrategi A, Burgueño M, et al. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*. 2015;43(7):1161-8.
215. Williamson RA. Surgical management of bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(3):251-5.
216. Abtahi J, Agholme F, Aspenberg P. Prevention of osteonecrosis of the jaw by mucoperiosteal coverage in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(5):632-6.
217. Mozzati M, Martinasso G, Maggiora M, Scoletta M, Zambelli M, Carossa S, et al. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Investig*. 2012:1-8.

218. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(4):489-96.
219. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010;5(2):103-10.
220. Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World journal of stem cells*. 2014;6(3):312-21.
221. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4):e1886.
222. González-García M, Rodríguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodríguez-González MA, Oñate-Sánchez R, et al. Cell therapy in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg*. 2013;24(3):e226-8.
223. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499-506.
224. Wolf D, Wolf AM. Mesenchymal stem cells as cellular immunosuppressants. *Lancet*. 2008;371(9624):1553-4.
225. Rajabi H, Sheikhan Shahin H, Norouzian M, Mehrabani D, Dehghani Nazhvani S. The Healing Effects of Aquatic Activities and Allogenic Injection of Platelet-Rich Plasma (PRP) on Injuries of Achilles Tendon in Experimental Rat. *World journal of plastic surgery*. 2015;4(1):66-73.
226. Liao HT, Chen CT. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells*. 2014;6(3):288-95.
227. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.
228. Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*. 2009;17(4):540-7.
229. Georgiev-Hristov T, García-Arranz M, García-Gómez I, García-Cabezas MA, Trébol J, Vega-Clemente L, et al. Sutures enriched with adipose-derived

stem cells decrease the local acute inflammation after tracheal anastomosis in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012;42(3):e40-e7.

230. Tomoyasu A, Higashio K, Kanomata K, Goto M, Kodaira K, Serizawa H, et al. Platelet-rich plasma stimulates osteoblastic differentiation in the presence of BMPs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361(1):62-7.

231. Lesclois P, Abi Najm S, Carrel J-P, Baroukh B, Lombardi T, Willi J-P, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? *Bone*. 2009;45(5):843-52.

## **LISTA DE PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL**

### Presentaciones en congresos

**1. "Platelet rich plasma and adipose-derived stem cells for treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in a murine model".**

Comunicación póster: P Barba Recreo, D Garcia Molina, JL Del Castillo, M García Arranz, E Ruiz, M Burgueño

21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. ICOMS.

Barcelona. 21-24 Octubre 2013

**2. "Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: development of an experimental model in rats treated with zoledronic acid".** Comunicación

póster: P Barba-Recreo, JL Del Castillo, M García-Arranz, T Georgiev-Hristov, L Yévenes , M Burgueño

XXI Congress of the EACMFS. Dubrovnik. 11-15 Septiembre 2012

**3. "Osteonecrosis de los maxilares por bisfosfomatos: Desarrollo de un modelo experimental en ratas".** Comunicación, competición premios de investigación.

P Barba-Recreo, JL Del Castillo, M García-Arranz, L Yévenes , T Georgiev-Hristov, M Burgueño.

21º Congreso Nacional de Cirugía Oral y Maxilofacial. Valladolid. 8-10 Junio 2011.

## Publicaciones



### Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats

Paula Barba-Recreo<sup>a,\*</sup>, Jose Luis Del Castillo Pardo de Vera<sup>a</sup>, Mariano García-Arranz<sup>b</sup>, Laura Yébenes<sup>c</sup>, Miguel Burgueño<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery (Head of the Department: Miguel Burgueño), University Hospital La Paz, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Cell Therapy Laboratory (Head of the Department: Prof. Damián García Olmo), Unidad de Investigación, IdIPAZ, University Hospital La Paz, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pathology, University Hospital La Paz, Madrid, Spain

#### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Paper received 19 April 2013  
Accepted 4 November 2013

**Keywords:**  
Osteonecrosis of the jaws  
Bisphosphonates  
Zoledronic acid

#### ABSTRACT

**Introduction:** Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) is a pathologic condition of increasing frequency, with a poorly understood pathophysiology and which can be difficult to manage.

The aim of this study was to find a reproducible experimental model that directly relates chronic bisphosphonate administration with the development of osteonecrosis with or without tooth extraction, with no other drug involved.

**Material and methods:** Twenty male Wistar rats were divided into 4 groups ( $n = 5/\text{group}$ ). Animals were injected over 9 weeks with zoledronic acid (0.1 mg/kg). In groups 1 and 2 three times a week intraperitoneally, and in group 3 once a week intravenously. A control group (group 4) received intraperitoneal injections of saline solution three times a week. After 8 weeks of treatment, 3 right upper jaw molars were extracted in groups 1, 3 and 4 and all rats were sacrificed 1 week later. The maxillae were histologically analyzed for presence of osteonecrosis foci, number of osteoclasts, vascularity, bone resorption status and presence of abscess. Radiographic examination was performed with a plain radiograph of each hemi-head.

**Results:** We found that group 1 (dental extractions and highest cumulative dose of zoledronic acid) had the highest incidence of osteonecrosis (80%), absence of bone resorption (100%) and lowest number of osteoclasts (mean 7.9/field at 40 $\times$ ). Zoledronic acid-treated groups showed variable degrees of osteosclerosis and trabecular disorganization on X-ray study.

**Conclusions:** We offer a new animal model of BRONJ after zoledronic acid administration and dental extractions, achieving bone changes similar or superior to previous studies, highlighting the dental extraction as an important trigger factor.

© 2013 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Bisphosphonates (BPs) are antiresorptive drugs (Rodan and Fleisch, 1996) which have been used for over 40 years to treat different diseases and conditions with increased bone resorption, such as osteolytic bone metastases, Paget's disease, hypercalcemia, primary and secondary hyperparathyroidism and osteoporosis (Lewiecki, 2011).

Since 2003 bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) has emerged as an important comorbidity, of increasing frequency, especially in patients treated for a long time with high

doses of bisphosphonates (Marx, 2003; Wang et al., 2003; Ruggiero et al., 2004, 2006; Marx et al., 2005; Ruggiero et al., 2006). To date, there is no effective curative treatment, especially for advanced stage disease patients (Ziebart et al., 2011). Several pathogenic theories have been proposed, focused on osteoclast inhibition, antiangiogenic processes, mucosal toxicity and cytokine-mediated inflammation (Galluzzo et al., 2007). However, the exact mechanisms need further investigation.

In order to progress research into new treatment methods, it is important to gain more knowledge on the underlying mechanisms, beginning with studies at an experimental level. Currently there is no standard BRONJ animal model. Review of the published literature shows a great heterogeneity of models in terms of experimental animals, bisphosphonate type and method of administration, dose, application time and concomitant treatments (corticoids, immunosuppressive drugs) (Hikita et al., 2009; Sonis et al., 2009; Aguirre

\* Corresponding author. University Hospital La Paz, 7th Floor, Hospital General, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Paseo de la Castellana 261, PC 28046, Madrid, Spain. Tel.: +34 627663809.

E-mail address: p.barba.recreo@gmail.com (P. Barba-Recreo).



ARTICLE IN PRESS

2

P. Barba-Recreo et al. / Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery xxx (2013) 1–7

et al., 2010; Bi et al., 2010; Biasotto et al., 2010; Hokugo et al., 2010; Kobayashi et al., 2010; López-Jornet et al., 2010; Senel et al., 2010; Aghaloo et al., 2011; Cankaya et al., 2011; Marino et al., 2012; Conte Neto et al., 2013). There are several other factors, such as previous trauma (King and Umland, 2008), chemotherapy, anemia, coagulopathies, infections, periodontal disease and tobacco (Junquera and Gallego, 2008; Wessel et al., 2008; Ruggiero et al., 2009), that are thought to influence BRONJ development in observational clinical and small experimental studies. As a result, a low and variable percentage of BRONJ (applying BP alone) has been described in a limited number of experimental models mainly in rats (between 0 and 80% of osteonecrosis) (Huja et al., 2011; Maahs et al., 2011) with different BP types (mainly using zoledronic acid, see Table 1) and times of application. Thus, a standardized and reproducible model of BRONJ that represents the most common clinical scenario is urgently needed in order to advance with the research of new treatments.

The purpose of this study was to obtain an animal model of osteonecrosis in the jawbones by application of zoledronic acid combined with dental extraction, without other potential co-factors, and thus reproduce the real clinical situation and study the direct effects of bisphosphonates.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study design

The present study has been approved by the Ethical Committee for Animal Care of the University Hospital La Paz, Madrid, Spain. It was conducted following the European Union guidelines for experimental animal use.

Twenty Wistar male rats (Charlie Rivers, France) with an average age of 8 weeks were used. They were kept in a controlled environment of temperature and 12 h light–dark cycles, with food and water supplies *ad libitum*.

Zoledronic acid (Zometa, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) was chosen because of its high relative potency, in order to increase the probability of osteonecrosis.

Table 1

Summary of the main experimental models used to study the induction of BRONJ in murines.

Author	Bisphosphonate dose	Association with other drugs	Co-factors	Percentage of osteonecrosis
Sonis et al., 2009	0.075 mg ZA/Kg sc	Dexamethasone (Dex)	Dental extraction	ZA/Dex 80%
			Wound suture	ZA 60%
Huja et al., 2009	0.1 mg ZA/kg ip	No	No dental extraction	ZA 0 %
Senel et al., 2010	0.1 mg ZA/kg ip	No	Dental extraction	ZA 20 %
Kobayashi et al., 2010	0.250 mg ZA/kg sc	No	Dental extraction	ZA 0 %
Bi et al., 2010	0.125 mg ZA/kg ip	Dexamethasone Docetaxel (Doc)	Dental extraction	ZA/Dex/Doc 100%
				ZA/Dex 27%
				ZA 0%
				ZA 100%
Biasotto et al., 2010	0.04 mg ZA iv	No	Dental extraction	ZA/Vit D Def 66.7%
Hokugo et al., 2010	0.035 mg ZA/kg iv	No	Bone drilled defect	ZA 14.3 %
			Dental extraction	Vitamin D deficiency (Vit D Def)
López-Jornet et al., 2010	3 mg Pam/kg ip	Dexamethasone	Dental extraction	Pam 0%
				Pam/Dex 30%
Aguirre et al., 2010	0.015 mg Alen/kg ip	No	Dental extraction	Alen 40%
Maahs et al., 2011	0.6 mg ZA/kg ip	No	Dental extraction	ZA 80 %
	0.5 mg Alen/kg vo	No		Alen 0%
Cankaya et al., 2011	0.075 mg ZA/kg sc	Dexamethasone	Dental extraction	ZA/Dexa 60 %
Aghaloo et al., 2011	0.066 mg ZA/kg ip	No	Periodontal disease	ZA 47%
Marino et al., 2012	0.02 mg ZA/kg iv	No	Root extraction	ZA 75 %
Aguirre et al., 2012	0.08 mg ZA/kg iv	No	Periodontitis	ZA 50%
	0.015 mg Alen/kg sc	No		Alen 0%
Abtahi et al., 2012	0.2 mg Alen/kg sc	Dexamethasone	Dental extraction	Alen/Dexa 100%
			Mucosal wound	Alen 0%
			Dental extraction	Alen100%
Conte Neto et al., 2013	1 mg Alen/kg sc	No		

The highest percentage of animals with BRONJ obtained in the each model and the association with other drugs and co-factors are indicated in the table. ZA – Zoledronic Acid. Pam – Pamidronate. Alen – Alendronate. ip – Intraperitoneal administration, iv – intravenous administration, sc – Subcutaneous administration, vo – Oral administration. Dex – Dexametason. Doc – Docetaxel. Vit D Def – Vitamin D deficiency.

Please cite this article in press as: Barba-Recreo P, et al., Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats, Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2013.11.005>

### 2.2. Groups of treatment

The animals were randomly assigned into 4 groups (Table 2).

ZA-treated groups were administered doses of 0.1 mg ZA/kg as suggested by other authors (Hikita et al., 2009; Huja et al., 2009, 2011). The drug was applied intraperitoneally in groups 1 and 2, three times a week. In group 3 the bisphosphonate was administered intravenously once a week (via the tail vein). The whole treatment lasted 9 weeks in all groups. Control groups were given the same volume of saline solution intraperitoneally. Dental extractions were carried out under intraperitoneal general anesthesia (Ketamine 100 mg/kg + Diazepam 8 mg/kg + Atropine 0.4 mg/kg) after 8 weeks of treatment, in groups 1, 3 and 4. Three right upper molars were extracted with the animal in dorsal decubitus position and optical microscope assistance (Fig. 1). Molars were luxated with a spatulated osteotripping and a mosquito clamp as a forceps. Tramadol 0.075 mg/kg was administered daily subcutaneously for three postoperative days. One of the animals of group 3 died on the first postoperative day.

Euthanasia was performed 9 weeks after treatment, one week after dental extractions. Animals were euthanized under general anesthesia (inhaled Isoflurane with oxygen 3 L/min) by decapitation. Heads were harvested for further analysis.

### 2.3. Macroscopic analysis

All the jaws were photographed and the mucosa healing was evaluated by visual scale as either bone exposure or complete mucosa healing.

### 2.4. Sample preparation

The heads were fixed with 4% formaldehyde and sectioned sagittally with an electric metal saw. Plain radiographs (PHILIPS Diagnostic 93) were taken of each half-head.

Samples were decalcified with nitric acid over 72 h. Half-jaws were harvested *en bloc*. Alveolar bone was sectioned sagittally



## ARTICLE IN PRESS

P. Barba-Recreo et al. / Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery xxx (2013) 1–7

3

**Table 2**  
Animal distribution by groups.

Group	Number of rats	Dose	Number doses/week	Total number of doses	Dental extractions	Euthanasia (Weeks after extractions)
1	5	0.1 mg/kg ZA ip	3	27	Yes	1
2	5	0.1 mg/kg ZA ip	3	27	No	NA
3	5	0.1 mg/kg ZA iv	1	9	Yes	1
4	5	0.1 ml/kg saline ip (Control)	3	27	Yes	1

ZA or saline dosage, way and frequency of administration in each experimental group are shown in this table. ip – Intraperitoneal administration, iv – intravenous administration, NA – not applicable.

with a scalpel in buccal and palatal/lingual fragments. Blocks of each half-jaw were placed in 70% ethanol and further dehydrated in graded alcohol solutions and embedded in paraffin. Histological sections (5–6  $\mu$ m thick) of each alveolar process were cut in the mesiodistal plane and stained with hematoxylin-eosin.

### 2.5. Histologic analysis

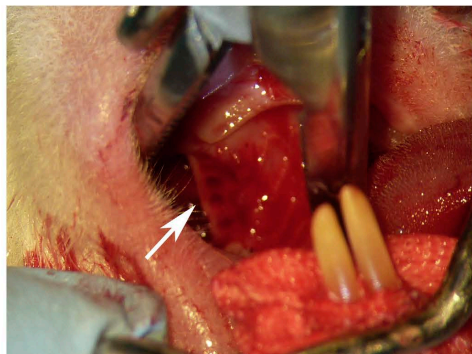
Histological analysis of hematoxylin-eosin stained sections was performed by a pathologist on a blinded fashion (light microscopy, 40 $\times$  magnification).

Several histological parameters were evaluated:

1. Osteonecrosis or necrotic foci: Defined as 8–10 adjacent empty lacunae in the alveolar bone, as previously described by Enlow and Yamashita (Basi et al., 2011; Yamashita et al., 2011).
2. Osteoclasts: Arithmetic mean of their count in 3 different fields (40 $\times$ ), in 2 different random cuts in the alveolar process of upper jaw.
3. Vascularization: Was evaluated in the alveolar processes of upper jaw and graded by a visual scale from 1 to 5 (1: absence of vessels, 5: duplication of the vascular surface area compared to this area in controls).
4. Degree of alveolar remodeling bone (after tooth extraction): A scale was established from 1 to 5 (1: absence of bone resorption, 5: 100% of alveolar bone area resorbed and substituted by fibrous tissue).

### 2.6. Radiographic analysis

Two maxillofacial surgeons evaluated the radiographies in a blinded fashion. Bone density was assessed using as a reference the



**Fig. 1.** Right upper jaw after extraction. White arrow pointing the alveolar sockets after molar extraction.

radiographic densitometric value of the control group. Osteonecrosis findings were defined as osteosclerosis, thickening and disorganization of the medullary trabeculation and cortical disruption at the right upper jaw, comparing with the characteristics of right upper jaw bone in control group. A visual scale was used to value all the parameters as present or absent.

### 2.7. Statistical analysis

Qualitative variables were analyzed with Pearson Chi-Square Test and Fisher's Exact Test. Quantitative variables were analyzed with nonparametric Kruskal–Wallis Test. A statistical level of significance of 0.05 was used in all cases. Analyses of the data was performed with the program SPSS v. 11.5.

## 3. Results

### 3.1. Macroscopic analysis

None of the animals showed bone exposure at extraction sites.

### 3.2. Histologic results

Osteonecrosis was found in 80% of the animals in group 1, in 25% of the animals in group 3 and 20% of controls. Most necrotic foci contained at least 6 to 8 lacunae (see Fig. 2A). The presence of acute inflammation, as an abscess, correlated with the presence of bony sequestra or food waste. Group 2 showed no necrotic foci. Osteonecrosis was located exclusively in alveolar bone within dental extractions.

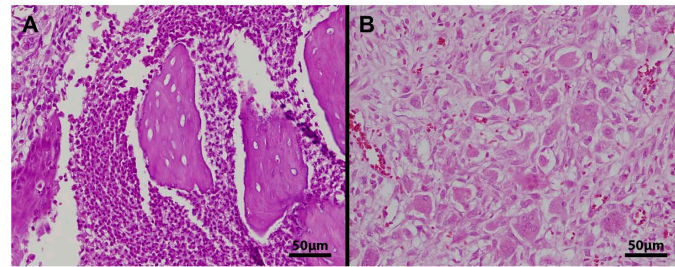
The highest osteoclasts mean value was found in the control group (17.6 osteoclasts/field at 40 $\times$ ), in contrast with the osteoclasts mean value found in group 1 (7.9 osteoclasts/field at 40 $\times$ ), group 2 (7.4 osteoclasts/field at 40 $\times$ ) and group 3 (10.7 osteoclasts/field 40 $\times$ ) (see Fig. 2B), although not statistically significant ( $p = 0.184$ ).

Vascularization analysis showed similar blood vessel count in groups 2, 3 and 4 (mean values of 3.4 in group 2; 3.5 in group 3 and 3.4 in group 4). Vascularization was decreased in group 1, with a mean value of 2.3. This difference was statistically significant ( $p = 0.044$ ) when compared to the rest of the groups.

Alveolar bone remodeling analysis showed minimal resorption after dental extraction in ZA-treated groups (Fig. 3A), with a mean value of 1 in group 1 and 2.1 in group 3. These results contrasted with controls (see Fig. 3B), with a mean value of 4.4. These differences in distribution of the bone resorption were statistically significant ( $p = 0.004$ ) after the analysis with Kruskal–Wallis test for independent samples. In group 2, bone resorption at the alveolar bone was not included in the comparative table, because animals underwent no dental extraction and they had regular bone with no increase of the bone turn-over.

Incomplete epithelial healing in sockets 1 week after dental extraction (middle point in socket healing process after dental extraction in rats (Hsieh et al., 1994)) was observed in 80% of the

Please cite this article in press as: Barba-Recreo P, et al., Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats, Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2013.11.005>



**Fig. 2.** Histologic images of extraction sockets. High magnification. A) Osteonecrosis foci typically surrounded by inflammatory infiltrate in Group 1. B) High number of osteoclasts was observed in the alveolar bone of the control group (Group 4).

animals of group 1. In group 3, 25% had similar findings and 40% of the animals in the control group presented incomplete mucosa healing (Group 4). In most specimens, this epithelium disruption was found in combination with osteonecrosis or remaining broken roots. No ulcerated mucosa was evidenced in group 2. It was not possible to estimate significant difference.

Abscesses were present in all groups with dental extractions: 80% in group 1, 50% in group 3 and 20% in group 4, in close relation with incomplete mucosa healing or osteonecrosis foci. No abscess was observed in group 2. It was not possible to estimate significance. Histological findings are summarized in Table 3.

### 3.3. Radiographic findings

Bone density analysis showed osteosclerosis in 80% of the animals in group 2 (ZA-treated specimens without dental extraction) (see Fig. 4D). In groups 1 and 3 (ZA-treated animals with dental extractions), the percentage of osteosclerosis at the alveolar bone decreases to 25% and 50% respectively.

Bone thickening and bone trabecular disorganization were present in 100% of the animals of group 2 (see Fig. 4D). This percentage was lower in groups with dental extractions: 80% in group 1 and 25% in group 3.

100% of the animals in group 1 had cortical disruption of alveolar bone in the right upper jaw (see Fig. 4B). 50% of the animals in group 3 and 20% in group 4 (controls) showed similar findings. Cortical disruption was not evaluated in group 2, because no dental extraction were carried out.

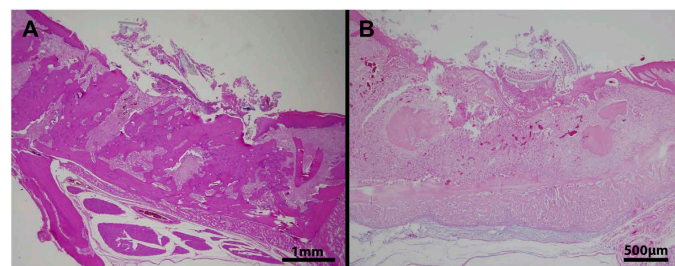
Radiographic findings are summarized in Table 4. No statistically significant differences were found on analysis of the radiographic features.

### 4. Discussion

Zoledronic acid is an amino-bisphosphonate for intravenous use, with the highest relative potency in this pharmacologic group (10,000 times higher than etidronate) (Dodson, 2009) and therefore is one of the BPs more frequently associated with the development of osteonecrosis and it is also one of the BPs most commonly used in animal experimental models (see Table 1).

In our study we aimed to develop a model of BRONJ lesions applying zoledronate alone. The dosing frequency was chosen to maximize drug exposure during the relatively short 9 weeks experimental period (Senel et al., 2010), in order to achieve a higher cumulative ZA dose in the experimental animals compared to the standard human cancer treatment (0.05 mg ZA/kg body weight, once a month), without additional toxicity.

The main theories about BRONJ point to the bone remodeling suppression, mediated by damage of osteoclasts that in cases of trauma, such as dental extraction, would lead to reduced bone repair. The results of our study showed a delay in the new bone formation in the animals treated with ZA comparing with controls, especially in those treated with higher cumulative doses (group 1). This is in close relation with the mean osteoclast count that was less than half that in group 1, than in the control group. These findings support the previously raised statement by many authors that the magnitude of the reduction in bone turn-over and the probability of



**Fig. 3.** Histologic images of extraction sockets. Low magnification. A) Hematoxylin-eosin staining of a ZA-treated specimen (Group 1) showing no alveolar bone resorption and discontinuous epithelial lining. B) Control specimen (Group 4) with complete alveolar bone resorption and substitution by fibrous tissue (early bone healing stage). Residual root tips are observed as occasional tooth fractures occurred during extractions due to root ankylosis, commonly seen in adult rat.

Please cite this article in press as: Barba-Recreo P, et al., Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats, Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2013.11.005>

ARTICLE IN PRESS

P. Barba-Recreo et al. / Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery xxx (2013) 1–7

5

**Table 3**  
Histologic findings.

Group	Osteonecrosis	Osteoclasts/40× field	Vascularity	Bone resorption	Incomplete mucosa healing	Early swelling (abscess)
1	80%	7.9 (1.5)	2.3 (0.4)	1 (0.0)	80%	80%
2	0%	7.4 (1.1)	3.4 (0.5)	NA	0%	0%
3	25%	10.7 (4.8)	3.5 (0.5)	2.1 (0.8)	25%	50%
4	20%	17.6 (8.7)	3.4 (1.0)	4.4 (0.8)	40%	20%

Percentage of animals of each group showing osteonecrosis, incomplete mucosa healing and abscess are presented in the table. Number of osteoclasts at 40× magnification field, the vascularity (scale 1–5, see the text) and bone resorption (scale 1–5, see the text) of each group are presented as mean (standard deviation). NA – not applicable.

BRONJ are related to the total bisphosphonate dose administered over a long period of time (Chapurlat and Delmas, 2006).

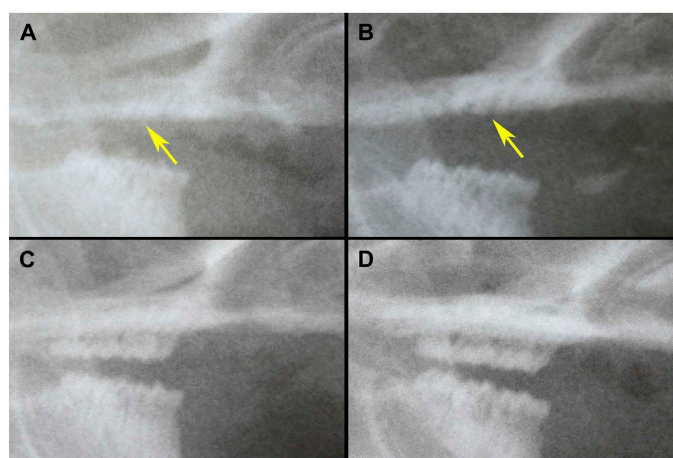
Entire bone resorption of the alveolar bone and substitution by fibrous matrix at the 7th day after dental extractions and complete new bone formation at the 14th day, are consecutive healing stages of the alveolar bone in rats (Hsieh et al., 1994; Hikita et al., 2009). Hikita et al. observed a decreased resorption in the alveolar bone after long lasting bisphosphonate treatment, at the 7th day after dental extractions (Hikita et al., 2009). In our model, we also found statistically significant differences in bone resorption between treated groups and controls ( $p = 0.004$ ). The delay in initial socket healing seems to be secondary to disruption of the bone remodeling mechanism, allowing the persistence of defective and necrotic bone (Subramanian et al., 2011).

In this study, osteonecrosis (sequestra) was seen in 80% of the specimens in group 1, a percentage achieved by few experimental models with BP-treatment and dental extractions (Maahs et al., 2011; Conte Neto et al., 2013). Some authors have given corticoids or immunosuppressive drugs (Sonis et al., 2009; Bi et al., 2010; Kikuri et al., 2010; López-Jornet et al., 2010; Abtahi et al., 2012) in order to promote the antiresorptive action. These associations gave higher rates of osteonecrosis compared to exclusive ZA-treatment with dental extractions in each experimental model (Table 1). Other co-factors used in murine ZA-treatment models are vitamin D deficiency (Hokugo et al., 2010), a drilled bone defect rounding the dental extraction socket (Biasotto et al., 2010) or

mucosal lesion (Aghaloo et al., 2011; Yamashita et al., 2011; Abtahi et al., 2012; Aguirre et al., 2012). In our study, the real effect of ZA in alveolar bone is shown, as no other drug was administrated. We found that animals with ZA-treatment and no dental extractions had no evident osteonecrosis foci, linking dental trauma as a trigger factor in treated animals with the probability for the development of BRONJ, as shown in experimental (Maahs et al., 2011; Abtahi et al., 2012; Pautke et al., 2012; Conte Neto et al., 2013) and clinical studies (Marx et al., 2005; Wessel et al., 2008; Barasch et al., 2011). The high heterogeneity of BRONJ criteria (histologic osteonecrosis definition) used among the animal models makes it difficult to compare them and complicates the evaluation of the applied treatments. Therefore we consider that a “minimum BRONJ criteria” in animals including histologic findings, should be developed.

Vascularization of alveolar sockets 7 days after extractions in our study, showed a statistically significant difference ( $p = 0.044$ ) between treated animals and controls. Similar findings were observed by other authors (Kobayashi et al., 2010; Wehrhan et al., 2011; Conte Neto et al., 2013) and attributed to the antiangiogenic effect of the BPs (Wood et al., 2002).

The persistence of bone exposure in the oral cavity for at least 8 weeks has been recognized as an established diagnostic criterion according to AAOMS (Ruggiero et al., 2009), and this concept has been extended to animal models of BRONJ-like lesions (Bi et al., 2010; Biasotto et al., 2010; Hokugo et al., 2010; Marino et al.,



**Fig. 4.** Radiographic findings. A) Control specimen with extraction: the extraction site presents a well-defined alveolar ridge (yellow arrow). B) ZA-treated specimen showing cortical disruption at alveolar upper jawbone and areas of mixed radiodensity (yellow arrow). C) Control specimen without extractions with density and trabecular pattern consistent with normal bone. D) Bone osteosclerosis and thickening in the upper jawbone after ZA-treatment and no dental extractions.

Please cite this article in press as: Barba-Recreo P, et al., Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats, Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2013.11.005>



ARTICLE IN PRESS

6

P. Barba-Recreo et al. / Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery xxx (2013) 1–7

**Table 4**  
Radiographic findings.

Group	Osteoscleroses	Bone thickening/disorganization of medullar trabeculation	Cortical disruption
1	40%	20%	100%
2	80%	100%	NA
3	50%	25%	50%
4	0%	0%	20%

Percentage of osteonecrosis, bone thickening and/or medullar trabecular disorganization and cortical disruption of each group of animals are summarized. NA – not applicable.

2012; Pautke et al., 2012). Non-exposed bone stages of BRONJ in humans are currently controversial, with several authors claiming a diagnosis and treatment redefinition of this variant, with more emphasis on symptomatology and radiographic findings of osteonecrosis (Junquera and Gallego, 2008; Patel et al., 2012). Although the alveolar healing phases are similar in both humans and rats, they occur more rapidly in rodents than in humans, about one-third of the time required for human healing (Okamoto and de Russo, 1973). We did not observe macroscopic bone exposure 7 days after the extractions in any group, probably because of the high regeneration capacity of the rat gingiva. Microscopically, ulcerated mucosa was observed but it was not possible to estimate significant difference in mucosa healing between groups. Bone exposure was observed in only a few studies with BP-treatment alone and dental extractions, in bigger mammals like minipigs (Pautke et al., 2012) and in a rat model with a very high dose of Alendronate (1 mg/kg/day for 3 months) (Conte Neto et al., 2013). A BP-related transient decrease of socket healing, only during the first 10 postextraction days, is suggested as the cause for lower rates of bone exposure observed in rats (Aguirre et al., 2010). Some studies show bisphosphonates may cause toxicity to keratinocytes, inhibiting epithelial healing and it might be related to the development of osteonecrosis (Landesberg et al., 2008). Therefore, it seems high cumulative dose of BPs is needed to reproduce a BRONJ lesions in a rat model.

Histological features are not included in the AAOMS's BRONJ definition in humans, which is based on clinical features and symptoms, but in small animals like murines, with difficult evaluation of the symptoms like pain, the histologic and radiographic findings are the main tools for defining the osteonecrosis related to bisphosphonates. Besides the characteristics of murine healing that may be difficult to extrapolate to humans, small animal models are indicated for the study of infrequent but severe events like BRONJ, with an incidence of 0.8–12 % of intravenous bisphosphonate treated patients (Ruggiero et al., 2009). They are cost-effective, easy to handle and are widely used for proof-of-concept studies (as ours), for initial cause-effect and pilot studies of new treatment methods. Furthermore, their use causes less ethical and logistic issues, especially for long lasting treatments, such as the case of BRONJ that needs a long and costly period of drug administration and could potentially cause pain. The well-known disadvantages are their fast metabolism and better healing than in human, and the size limitation in case of surgical models. Therefore, at present, we consider rat models suitable for progressing with the studies of the pathogenesis and initial treatment modalities.

With this study we expect to increase knowledge about the poorly understood pathophysiology and histologic presentation of BRONJ. Absence of bone resorption, poor vascularity and low number of osteoclasts were found in alveolar sockets in high dose ZA-treated rats, highlighting the effect of BPs delaying bone turnover as an important factor in the development of BRONJ after dental extractions. Our model brings clues (dose, way of administration, length of treatment) in how to develop an ideal BRONJ

model in rats. With our results and after analyzing the other rodent models with their peculiarities and results achieved, we expect to provide useful data for further advance in the research of this severe disease.

## 5. Conclusions

This experimental study shows that tooth extraction could trigger BRONJ-like lesions in rats after chronic administration of zoledronic acid, in the absence of any co-medication. ZA-treatment alone does not produce a condition sufficient for jaw osteonecrosis in rats, although it induces radiographic changes on the alveolar bone.

Histologic osteonecrosis rate reached in this experimental study is similar or superior to other published models, associating in many of them immunosuppressive drugs, potentiating the anti-regenerative properties of the bisphosphonates. However, similarly to most of the experimental animal studies, we haven't achieved bone exposure. With this new model we expect to promote the development of further studies of contributing factors for BRONJ and potential treatments.

## Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest with any financial organization regarding the issues discussed in this manuscript.

## Acknowledgments

We thank to Carlota Largo, veterinarian of Experimental Surgery Department for the logistical support and experimental animal care and Dr. Tihomir Georgiev Hristov for revision of the manuscript. This work was supported by a grant from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Spain (PI10-01991), a grant from Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2420) and a RETICS grant of ISCIII (RD12/0019/0035).

## References

- Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P: Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med* 41: 494–499, 2012
- Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, et al: Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res* 26: 1871–1882, 2011
- Aguirre J, Altman M, Vanegas S, Franz S, Bassit A, Wronski T: Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis* 16: 674–685, 2010
- Aguirre JJ, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams A, Jorgensen M, et al: Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res* 27: 2130–2143, 2012
- Barasch A, Cunha-Cruz J, Curro FA, Hujuel P, Sung AH, Vena D, et al: Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. *J Dent Res* 90: 439–444, 2011
- Basi DL, Hughes PJ, Thumbigere-Math V, Sabino M, Mariash A, Lunos SA, et al: Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of zoledronic acid-treated rats. *J Oral Maxillofac Surg* 69: 2698–2707, 2011
- Bi Y, Gao Y, Ehrlichou D, Cao C, Kikuri T, Le A, et al: Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol* 177: 280–290, 2010
- Biasotto M, Chiandussi S, Zaccagna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, et al: A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med* 39: 390–396, 2010
- Cankaya AB, Erdem MA, Isler SC, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, et al: Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in an experimental rat model. *Int J Med Sci* 8: 667–672, 2011
- Chapurlat RD, Delmas PD: Drug insight: bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2: 211–219, 2006
- Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E: Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol* 94: 65–73, 2013
- Dodson TB: Intravenous bisphosphonate therapy and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 44–52, 2009

Please cite this article in press as: Barba-Recreo P, et al., Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2013.11.005>

ARTICLE IN PRESS

P. Barba-Recreo et al. / Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery xxx (2013) 1–7

7

- Galluzzo S, Santini D, Vincenzi B, Caccamo N, Meraviglia F, Salerno A, et al: Immunomodulating role of bisphosphonates on human gamma delta T cells: an intriguing and promising aspect of their antitumour activity. *Expert Opin Ther Targets* 11: 941–954, **2007**
- Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S: Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab* 27: 663–672, **2009**
- Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, et al: Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res* 25: 1337–1349, **2010**
- Hsieh YD, Devlin H, Roberts C: Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. *Arch Oral Biol* 39: 425–428, **1994**
- Huja SS, Fernandez SA, Phillips C, Li Y: Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Arch Oral Biol* 54: 851–856, **2009**
- Huja SS, Mason A, Fenell CE, Mo X, Hueni S, D'Atri AM, et al: Effects of short-term zoledronic acid treatment on bone remodeling and healing at surgical sites in the maxilla and mandible of aged dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 69: 418–427, **2011**
- Junquera L, Gallego L: Nonexposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: another clinical variant? *J Oral Maxillofac Surg* 66: 1516–1517, **2008**
- Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al: Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 25: 1668–1679, **2010**
- King A, Umland E: Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphosphonates. *Pharmacotherapy* 28: 667–677, **2008**
- Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, et al: Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab* 28: 165–175, **2010**
- Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, et al: Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 839–847, **2008**
- Lewiecki EM: Safety of long-term bisphosphonate therapy for the management of osteoporosis. *Drugs* 71: 791–814, **2011**
- López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V: An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague–Dawley rats. *J Oral Pathol Med* 39: 697–702, **2010**
- Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K: Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck* 33: 199–207, **2011**
- Manno KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM, et al: Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol* 38: 511–518, **2012**
- Marx RE: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 1115–1117, **2003**
- Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V: Bisphosphonate-Induced exposed bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 1567–1575, **2005**
- Okamoto T, de Russo MC: Wound healing following tooth extraction. *Histochemical study in rats. Rev Fac Odontol Aracatuba* 2: 153–169, **1973**
- Patel S, Choyee S, Uyanne J, Nguyen AL, Lee P, Sedghizadeh PP, et al: Non-exposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a critical assessment of current definition, staging, and treatment guidelines. *Oral Dis* 18: 625–632, **2012**
- Pautke C, Kreutzer K, Weitz J, Knodler M, Munzel D, Wexel G, et al: Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a minipig large animal model. *Bone* 51: 592–599, **2012**
- Rodan GA, Fleisch HA: Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest* 97: 2692–2696, **1996**
- Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B: American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws-2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 2–12, **2009**
- Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102: 433–441, **2006**
- Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL: Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 62: 527–534, **2004**
- Senel FC, Duman MK, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, et al: Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109: 385–391, **2010**
- Sonis ST, Watkins BA, Lyne GD, Lerman MA, Anderson KC: Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions: mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol* 45: 164–172, **2009**
- Subramanian G, Cohen HV, Quek SYP: A model for the pathogenesis of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw and teriparatide's potential role in its resolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112: 744–753, **2011**
- Wang J, Goodger NM, Pogrel MA: Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 1104–1107, **2003**
- Wehrhan F, Stockmann P, Nkenke E, Schlegel KA, Guentsch A, Wehrhan T, et al: Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112: 216–221, **2011**
- Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI: Zoledronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: a case-control study. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 625–631, **2008**
- Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Deyv L, Foidart JM, et al: Novel anti-angiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 1055–1061, **2002**
- Yamashita J, Koi K, Yang D-Y, McCauley LK: Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res* 17: 1405–1414, **2011**
- Ziebart T, Koch F, Klein MO, Guth J, Adler J, Pabst A, et al: Geranylgeraniol – a new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *Oral Oncol* 47: 195–201, **2011**

Please cite this article in press as: Barba-Recreo P, et al., Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2013.11.005>





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery

journal homepage: [www.jcmfs.com](http://www.jcmfs.com)



## Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model



Paula Barba-Recreo <sup>a,\*,1</sup>, Jose Luis Del Castillo Pardo de Vera <sup>a</sup>,  
Tihomir Georgiev-Hristov <sup>b,c</sup>, Elena Ruiz Bravo-Burillos <sup>d</sup>, Ander Abarrategi <sup>e,f</sup>,  
Miguel Burgueño <sup>a,g,2</sup>, Mariano García-Arranz <sup>b,g,2</sup>

<sup>a</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery (Head: Miguel Burgueño), Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Cell Therapy Laboratory (Head: Damián García Olmo), Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of General Surgery, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Pathology, Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

<sup>e</sup> Cellular Biotechnology Unit, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo km 2.200, 28220 Majadahonda, Spain

<sup>f</sup> Haematopoietic Stem Cell Laboratory, Cancer Research UK, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LY, United Kingdom

<sup>g</sup> Department of Surgery, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo s/n, 28029 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Paper received 8 December 2014

Accepted 30 April 2015

Available online 9 May 2015

#### Keywords:

Adipose-derived stem cells

Platelet-rich plasma

Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw

Zoledronic acid

### ABSTRACT

**Objectives:** The main challenge in treating bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is the absence of an effective established treatment. We aimed to compare different potentially preventive treatments for BRONJ after dental extractions in zoledronic acid (ZA)-treated animals. We studied the local application of different combinations of adipose-derived stem cells (ASCs) with or without previous stimulation with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and platelet-rich plasma (PRP) in rats.

**Material and methods:** Fifty-six male Wistar rats were treated with ZA for 9 weeks. Dental extractions were performed in the eighth week, and the animals were divided into 4 groups. In group 1 (n = 14), alveolar coverage with mucoperiosteal flap was performed. In group 2 (n = 14), PRP was applied over the sockets and covered with the flap. In group 3 (n = 15), allogeneic ASCs with PRP were applied and covered with the flap. In group 4 (n = 13), animals were treated with ASCs cultured with BMP-2, PRP, and flap coverage. Histologic, fluorescence, and radiologic studies of the maxillae were performed.

**Results:** ASC-treated animals showed lower frequency of osteonecrosis (14% vs 50%,  $p = 0.007$ ) and greater bone turnover ( $p = 0.024$ ) and osteoclast count ( $p = 0.045$ ) than those not receiving the ASC treatment.

**Conclusions:** In this high-risk model, ASC-based treatments seem to prevent BRONJ more effectively than mucosal flap with or without PRP. The combination of ASCs and PRP appears to be synergistic, and the addition of BMP-2 could further improve the results.

© 2015 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Servicio de Cirugía Maxilofacial, Calle Gladiolo, s/n, 28933 Móstoles, Madrid, Spain. Tel.: +34 627663809; fax: +34 914816216.

E-mail address: [p.barba.recreo@gmail.com](mailto:p.barba.recreo@gmail.com) (P. Barba-Recreo).

<sup>1</sup> Present address: Department of Oral and Maxillofacial Surgery (Head: Juan Rey Biel), Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Calle Gladiolo, s/n, 28933 Móstoles, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> These authors contributed equally to the work described in this manuscript.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2015.04.026>

1010-5182/© 2015 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Osteonecrosis of the jaw is a well-known, severe side effect of bisphosphonate (BP) treatment, and was first reported as a rare but serious complication 3 decades ago (Marx, 2003; Wang et al., 2003). BPs are anti-bone resorptive drugs used routinely to decrease osteoclast-mediated bone loss in osteoporosis, multiple myeloma, Paget disease, and complications of metastatic disease. A high percentage of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) cases have been reported in patients treated with high

doses of intravenous aminobisphosphonate (mainly zoledronic or pamidronic acid). An increased risk of BRONJ has been reported in intravenously treated cancer patients (odds ratio [OR] = 4.27) compared to those treated orally (OR = 1.18) (Lee et al., 2014). These patients often receive concomitant treatment with immunosuppressive and/or chemotherapy drugs, increasing the risk of osteonecrosis (Ruggiero et al., 2009; Anavi-Lev et al., 2013). Other risk factors include invasive dental procedures, oral infections, mechanical trauma to the jawbone, and long-term BP treatment (Dodson, 2009; Kuhl et al., 2012).

In addition to its low incidence, the main challenges of this complication are the limited knowledge of its pathogenesis and the absence of effective established treatment. These difficulties have led several research teams to explore new therapeutic strategies for treatment and prevention of BRONJ disease.

Mucosal coverage of alveolar sockets after dental extractions has been performed as treatment (Voss et al., 2012) and as a preventive measure (Abtahi et al., 2013) in order to avoid bacterial contamination and to increase blood supply to BP-affected bone during the healing process. Defective bone healing occurs in BRONJ because of suppressed bone turnover, likely favored by the antiangiogenic properties of potent BPs such as zoledronic acid (ZA) (Yamada et al., 2009; Anavi-Lev et al., 2013; Sharma et al., 2013). Therefore, it seems that stimulating angiogenesis locally could be an effective management strategy. Mesenchymal stem cells (MSCs) have recently emerged as candidates for BRONJ treatment (Kikuri et al., 2010; Cella et al., 2011; Gonzalez-Garcia et al., 2013; Li et al., 2013) due to their capacity to differentiate to other mesenchymal tissues such as bone, cartilage, and adipocytes (Pittenger et al., 1999), and due to the secretion of numerous cytokines with immunomodulatory and proangiogenic activity. Although the mechanisms of the immunosuppressive effects of MSCs have not been clearly defined, it seems that MSCs modulate the function of different cells involved in immune response (Yoo et al., 2009; Kikuri et al., 2010; Li et al., 2013) and tissue healing. MSCs have also been reported to be immunoprivileged cells, without human leukocyte antigen (HLA)-II expression and limited expression to HLA-I, a relevant feature since it would allow their allogeneic transplantation. Currently, allogeneic MSCs are used in different clinical trials (89 clinical trials registered on [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)); no adverse events have been reported to date.

Adipose tissue is an abundant and easily accessible source of MSCs, known as adipose-derived stem cells (ASCs). ASCs have been widely studied since they were first described in 2001 (Zuk et al., 2001), and have shown great potential in enhancing wound healing (Toyserkani et al., 2014). Bone-inducing substances such as bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) have been used to culture MSCs for treatment of skeletal defects and bone diseases by promoting their differentiation to bone tissue (Cowan et al., 2005).

Another emerging treatment that has been used in BRONJ is platelet-rich plasma (PRP). Although only a small number of observational studies have been performed to investigate their effects, the positive results seem to be related to growth-factor as well as cytokine secretion that stimulate healing (Martins et al., 2012; Longo et al., 2014; Mathias Duarte et al., 2014; Sarkarat et al., 2014). In addition, investigators in new experimental studies are searching for regenerative properties in the combination of MSCs with PRP, promoting MSC function because of the great amount of substances released by activated platelets (Van Pham et al., 2013). Research into bone regeneration is focused on osteoblastic potential differentiation (Pak, 2012; Tajima et al., 2014).

No well-established models have been published in which the effectiveness of both PRP and MSCs are tested in BRONJ treatment. Faced with the adverse situation of a lack of established preventive

treatment for BRONJ after dental extractions together with sub-optimal current treatments, we aimed to compare the effectiveness of different emerging therapies in preventing BRONJ development by using a rat model with dental extractions. To accomplish this, we studied the local application of different combinations of ASCs with and without previous stimulation with BMP-2 and PRP in rats.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study design

A rat model was chosen to test four different treatments applied after dental extractions in bisphosphonate-treated animals; to do this, we followed our previously published BRONJ-like disease model (Barba-Recreo et al., 2014), which replicates the histologic and radiographic findings of the human disease. Following this BRONJ model, the bisphosphonate chosen was ZA because of its high relative potency.

The present study was approved by the Ethical Committee for Animal Care of the University Hospital La Paz, Madrid, Spain. It was conducted in accordance with the European Union guidelines for experimental animal use.

Fifty-six adult male Wistar rats (Charles Rivers, France) with an average age of 8 weeks (mean weight 350 g) were used in this study. The animals were kept in an environment with a controlled temperature and 12-hour light–dark cycles, with food and water supplied *ad libitum*.

All animals received intraperitoneal ZA (Zometa 0.1 mg/kg, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) three times a week for a period of 9 weeks. Extractions of the three right upper molars in each animal were performed in the eighth week of treatment (Barba-Recreo et al., 2014).

Oral surgery was carried out under general anesthesia (inhaled sevoflurane, 2 mL/min with oxygen 1 L/min) with the animal in supine position, with the assistance of an optical microscope. Tramadol 0.075 mg/kg was administered subcutaneously each day for the first 3 postoperative days.

The animals were randomly assigned into four groups as follows.

In group 1 (n = 14), animals were treated with a buccal mucoperiosteal flap to cover the alveolar bone postextractions. Light subperiosteal debridement and advancement of the buccal mucosa were performed. Gingival borders were attached with a 6/0 silk continuous suture, covering the defect without tension.

In group 2 (n = 14), animals were treated with allogeneic PRP applied over the alveolar sockets after dental extractions. The same mucoperiosteal flap as in group 1 was performed to retain and cover the PRP clot over the maxillary alveolar bone.

In group 3 (n = 15), animals were treated with allogeneic ASCs. One million ASCs included in a PRP clot were applied over the alveolar sockets. The aforementioned mucoperiosteal flap was used to retain the ASCs with PRP in the area of interest (Fig. 1).

In group 4 (n = 13), animals were treated with 1 million ASCs cultured with BMP-2 applied over the alveolar sockets. A PRP clot and a mucoperiosteal flap affixed over the clot were used as covering layers.

One week after dental extractions, the animals were killed by decapitation while under general anesthesia (inhaled isoflurane with oxygen 3 L/min). The heads were harvested for further histologic, fluorescence, and radiologic studies.

### 2.2. PRP preparation

Allogeneic PRP was obtained from the blood of 3 healthy donor Wistar rats by intracardiac puncture (2 mL blood collected per



donor animal) under general anesthesia (inhaled isoflurane with oxygen 3 L/min) and stored in sodium citrate tubes. The tubes were centrifuged for 10 min at 3500 rpm at room temperature. The first 500  $\mu$ L of plasma (platelet-poor fraction) of each tube was discarded, and 450  $\mu$ L of plasma from the closest region to the buffy coat was collected, avoiding cell collection. Aliquots (100- $\mu$ L) of PRP were prepared and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

For clot formation, aliquots of PRP were defrosted, and 1.5  $\mu$ L of  $\text{CaCl}_2$  dissolved in deionized water at a concentration of 2.3 mg/mL (10%) was added to each 25  $\mu$ L of PRP. Aliquots of the final volume measuring 26.6  $\mu$ L each were incubated for 3–5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  until a manageable clot was obtained. These clots were later applied over the alveolar sockets (group 2 animals) within 20–30 min after activation.

For group 3 (PRP with ASCs), PRP was prepared as described above. After centrifugation of the ASCs at 1,500 rpm, 1 million cells were resuspended in a previously generated aliquot of PRP prior to clot formation by incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ .

In group 4, ASCs with BMP-2 were not applied in a PRP clot due to BMP-2 interference with the  $\text{CaCl}_2$  during the clot activation. ASCs with BMP-2 (1 million cells suspended in 25  $\mu$ L of saline) were applied over the alveolar sockets and covered with a PRP clot in the same fashion as in group 2.

### 2.3. ASC isolation, cell culture, characterization, and labeling

Allogeneic ASCs were obtained from the subcutaneous fat tissue of three female donor Wistar rats (the same donor animals used for PRP preparation) according to a previously described protocol in humans, with minor modifications (Zuk et al., 2001). Fat tissue was ground into small pieces and digested with type 1 collagenase (0.075%; Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK). The collagenase was then inactivated by the addition of an equal volume of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL), which contained 10% of fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL). The digested tissue was centrifuged at 250 g for 10 min, and the pellet was resuspended in 0.16 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for erythrocyte lysis. After filtering through a 70- $\mu$ m nylon mesh, the cells were plated in culture dishes and cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humid atmosphere with 5% carbon dioxide in the DMEM (Gibco BRL) containing 10% FBS (Gibco BRL) and 1% penicillin–streptomycin (Gibco BRL). The medium was changed to remove nonadherent cells 24 h after seeding, and every 3–4 days thereafter. For subculturing, cells were detached with 0.05% (v/v) trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Gibco BRL) in

phosphate-buffered saline when 70%–80% confluence was reached. In the third subculture, when 60%–70% confluence was reached, all cells were frozen until the week before their use.

For characterization of ASCs, cell cultures were analyzed by four-color flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) after staining with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. The following conjugated antibodies were used at saturating quantities: Alexa Fluor 647–conjugated CD90, CD29, CD45, and CD11b (Serotec, Spain). Briefly,  $2 \times 10^5$  nucleated cells were incubated for 20 min at room temperature with the above-mentioned antibodies. Data acquisition and analysis were performed using the CELLQuest PRO software program (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).

Once thawed, the cells were cultured for 1 week and, prior to implantation, ASCs were marked with PKH-26 (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) following the protocol of the manufacturer, for groups 3 and 4.

For group 4, ASCs were cultured with 1  $\mu$ g/mL BMP-2 (Noricum SL, Madrid, Spain) for 10 days, with the medium being renewed each 4 days under standard conditions.

One million allogeneic ASCs were applied in each maxilla in groups 3 and 4 according to the protocol described in the section on PRP preparation.

### 2.4. Macroscopic analysis

Mucosa healing was assessed visually as either bone exposure or complete mucosa healing.

### 2.5. Sample preparation

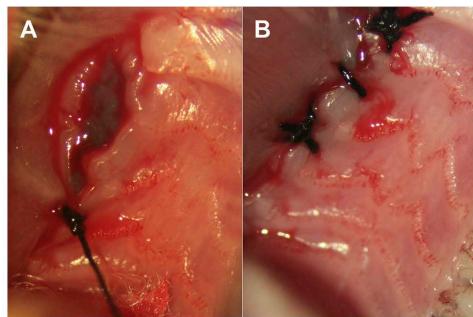
The rat heads were fixed with 4% formaldehyde and sectioned sagittally with an electric metal saw. Plane radiographs (PHILIPS Diagnostic 93) were taken of each half-head. Samples were then decalcified with nitric acid over 72 h. The half-jaws were harvested *en bloc*. Alveolar bone was sectioned sagittally with a scalpel in buccal and palatal/lingual fragments. Blocks of each half-jaw were placed in 70% ethanol and further dehydrated in graded alcohol solutions and embedded in paraffin. Histologic sections (5- to 6- $\mu$ m thick) of each alveolar process were cut along the mesiodistal plane and stained with hematoxylin–eosin and trichrome.

### 2.6. Histologic analysis and cell tracing

Histologic analysis was performed by a pathologist in blinded fashion (light microscopy,  $\times 40$  magnification).

Several histologic parameters were evaluated, as follows. (1) Osteonecrosis or necrotic foci, defined as 8 to 10 adjacent empty lacunae in the alveolar bone, as previously described by Enlow and Yamashita (Basi et al., 2011; Yamashita et al., 2011); (2) osteoclast counting: arithmetic mean of their count in three different fields ( $\times 40$ ), in two different random cuts in the alveolar process of upper jaw; (3) vascularization, evaluated at the level of the alveolar processes of the upper jaw and graded according to a visual scale from 1 to 5 (1 = absence of vessels, 5 = duplication of the vascular surface area compared to this area in rats with no ZA treatment (reference group from our previous study (Barba-Recreo et al., 2014))); and (4) degree of alveolar bone remodeling (after tooth extraction), using scale from 1 to 5 (1 = absence of bone resorption, 5 = 100% of alveolar bone area resorbed and substituted with fibrous tissue and new trabeculae).

Fluorescence analysis was performed for cell tracing. Sections were viewed under a fluorescent microscope (Leica DMI6000B,



**Fig. 1.** (A) Adipose-derived stem cells in platelet-rich plasma clot covering alveolar sockets after molar extractions in a rat from group 3. (B) Coverage of alveolar sockets with the mucoperiosteal flap and 6/0 silk continuous suture.



Wetzlar, Germany). The sections obtained from groups 1 and 2 (no ASCs applied) were used as negative controls.

### 2.7. Radiographic analysis

Two maxillofacial surgeons evaluated the radiographs in a blinded fashion. Bone density was assessed by using the radiographic densitometric value of healthy post-extracted bone as a reference, as shown in our established BRONJ rat model (Barba-Recreo et al., 2014). Findings suggestive of osteonecrosis were defined as osteosclerosis, thickening and disorganization of the medullary trabeculation, and cortical disruption in the right upper jaw.

### 2.8. Statistical analysis

Qualitative variables were analyzed using the Pearson  $\chi^2$  test and Fisher exact test. Quantitative variables were analyzed with nonparametric Kruskal–Wallis test or Mann–Whitney U test. The statistical significance level was set at 0.05. Analyses of the data were performed with the program SPSS v. 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 3. Results

### 3.1. Macroscopic results

None of the animals showed bone exposure at the extraction sites.

### 3.2. Histologic results

One specimen from group 1 and three specimens from group 2 were excluded from the final analysis due to technical problems with the histology, mainly with cutting samples.

Osteonecrosis foci were found in 54% of animals in group 2 and in 46% of animals in group 1, contrasting with lower incidence in group 3 (20%) and group 4 (8%) treated with ASCs. The mean value of osteoclasts was higher in group 4 (9.9 osteoclasts per field at  $\times 40$ ) and group 3 (8.4 osteoclasts per field at  $\times 40$ ) than in the rest of groups (7.4 osteoclasts per field at  $\times 40$  in group 2, and 7.2 osteoclasts per field at  $\times 40$  in group 1). Vascularity analysis showed a high blood vessel count in group 4 (mean 2.5); this number decreased in group 3 (2.1), group 2 (2.3), and group 1 (2.2). Nevertheless, alveolar bone remodeling analysis showed greater resorption in group 3 (mean 3.2) compared with the rest of groups (2.6 in group 4, 2.8 in group 2, and 1.9 in group 1). Incomplete epithelial healing was more frequent in group 3 (60%) 1 week after the surgery. Small abscesses were found in close relation to impacted food and suture remains in the submucosa; these were more frequent in group 4 (54%). Histologic results are summarized in Table 1 and Fig. 2.

The original design of the four groups brought an analysis of limited potency due to the low number of animals in each group. Therefore, we compared the treatments with and without ASCs at dental extraction sockets in ZA-treated rats (Table 2).

Osteonecrosis in alveolar bone was present in 50% of the animals without ASC treatment. This percentage decreased to 14% in animals treated with allogeneic ASCs. This difference was statistically significant ( $p = 0.007$ ). The difference in osteoclast count between groups treated with ASCs (9.0 osteoclasts per field  $\times 40$ ) and animals without ASC treatment (7.3 osteoclasts per field  $\times 40$ ) were also statistically significant ( $p = 0.045$ ). It was not possible to estimate significant differences during the vascularity analysis (2.2 in the group not treated with ASCs, and 2.3 in the ASC-treated

group). Bone resorption was higher in the ASC-treated group (2.9). When compared to the animals not treated with ASCs, the difference in bone remodeling observed at healing alveolar sockets (2.3) was statistically significant ( $p = 0.024$ ). Disruption at the mucosal surface and inflammatory infiltrates were found more often in specimens from ASC-treated rats (43%), although no significant difference with non-ASC-treated group (32%) was found.

### 3.3. Fluorescence results

ASCs were observed fully packed in the PRP clot remains 1 week after dental extractions in group 3. Furthermore, the cells were found throughout the whole alveolar socket in groups 3 and 4, from the submucosal area down to the bottom of the alveolar socket and the new trabecular bone (Fig. 3). No ASCs were located in the mucosa or in the alveolar bone.

### 3.4. Radiographic results

Plane radiograph analysis showed BRONJ features, including osteosclerosis, bone thickening, and cortical disruption of alveolar bone (Fig. 4 and Table 3).

Bone density analysis showed osteosclerosis in more than 85% of the rats in each group, a common consequence of BP treatment. Bone thickening was more frequent in group 2 (54%) and group 3 (47%). Nevertheless, cortical disruption of alveolar bone in the upper jaw was higher in group 1 (38%). It was not possible to estimate significant differences among the radiologic findings, either for the original four-group comparison or for the ASC/non-ASC group analysis.

## 4. Discussion

In order to lower the risk of BRONJ after traumatic injuries including dental extractions, several treatments are gaining popularity among oral surgeons, ranging from simple procedures such as mucosal flaps, to more sophisticated ones such as PRP and stem-cell applications. In the present work, we showed that adding ASCs could further decrease BRONJ incidence in a BRONJ high-risk model in rats, compared to non-ASC treatments (PRP and mucosal flap), with statistical significance. In order to not interfere with the immunological properties of the studied treatments (PRP and ASCs) and to allow us to better analyze the results without confounding factors, no other drugs were used (e.g., corticoids) to increase BRONJ incidence.

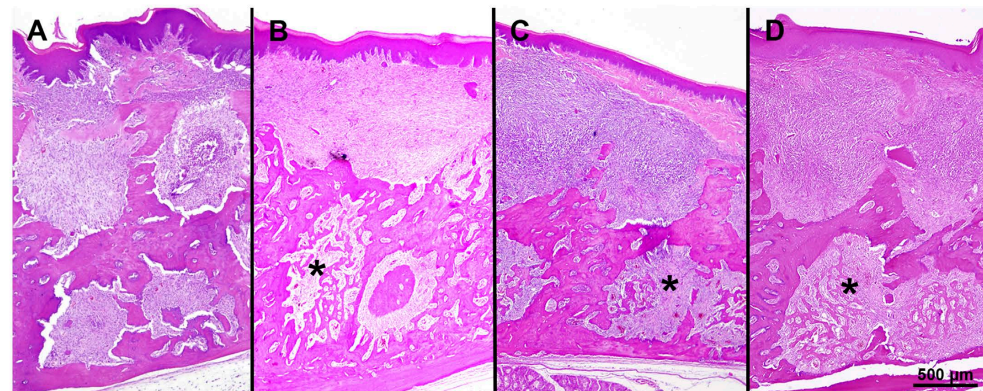
Some authors defend the use of local flaps, especially for resistant cases, in advanced stages of disease (Williamson, 2010; Voss et al., 2012), or for preventive reasons (Abtahi et al., 2013). For our experimental study, we chose a mucoperiosteal flap as a standard local preventive treatment after dental extractions. When the flap was the only measure applied, BRONJ incidence decreased from 80% (Barba-Recreo et al., 2014) to 46% in the present model. However, the percentage of BRONJ in animals treated with high doses of ZA remains too high to recommend the flap alone as a sufficient preventive treatment following dental procedures.

PRP is also an emerging BRONJ-preventive (Scoletta et al., 2011) and treatment method (Bocanegra-Pérez et al., 2012; Mozzati et al., 2012), and has been used in clinical practice in a more empirical fashion than based on higher scientific evidence. Platelets secrete several growth factors and cytokines that could decrease and shorten initial local inflammation, stimulate neoangiogenesis, and therefore promote tissue healing (Marx, 2004). PRP clot also seems to be less favorable to bacterial growth due to its pH values (Marx, 2004). Platelets release almost 95% of their presynthesized growth factors within the first hour of their activation and continue

**Table 1**  
Histologic findings of each group of treatment.

Group	Osteonecrosis	Osteoclasts per ×40 field	Vascularity	Bone resorption	Mucosal disruption	Inflammatory infiltrate (abscess)
1	46%	7.2 (3.0)	2.2 (0.8)	1.9 (0.8)	15%	15%
2	54%	7.4 (3.5)	2.3 (0.6)	2.8 (0.9)	18%	27%
3	20%	8.4 (3.7)	2.1 (0.8)	3.2 (0.7)	60%	13%
4	8%	9.9 (2.7)	2.5 (0.7)	2.6 (0.8)	23%	54%

Percentage of animals in each group showing osteonecrosis, mucosal disruption, and abscess are presented. Number of osteoclasts at ×40 magnification field, vascularity (scale 1–5; see text) and bone resorption (scale 1–5; see “Histologic results” section of “Material and methods”) of each group are presented as mean (standard deviation).



**Fig. 2.** Histologic images of dental sockets 1 week after extractions. Hematoxylin–eosin staining. (A) Group 1 animal: limited bone turnover with high alveolar crest. (B) Group 2 animal: partial crestal bone resorption and new trabecular bone (\*) at apical half of the socket. (C) Group 3 animal: high bone turnover. (D) Group 4 animal: high bone turnover with multiple new trabeculae forming (\*).

**Table 2**  
Histologic findings after regrouping in adipose-derived stem cells (ASC) or non-ASC treatment groups.

Group	Osteonecrosis	Osteoclasts per ×40 field	Vascularity	Bone resorption	Mucosal disruption	Inflammatory infiltrate (abscess)
No ASC treatment	50%	7.3 (3.2)	2.2 (0.8)	2.3 (0.9)	17%	21%
ASC treatment	14%	9.0 (3.3)	2.3 (0.8)	2.9 (0.8)	43%	32%
Significance	$p = 0.007$	$p = 0.045$	NS	$p = 0.024$	NS	NS

Percentage of animals of each group showing osteonecrosis, mucosal disruption, and abscess are presented. Number of osteoclasts at ×40 magnification field, vascularity (scale 1–5; see “Histologic results” section of “Material and methods”), and bone resorption (scale 1–5; see text) of each group are presented as mean (standard deviation). NS, not significant.

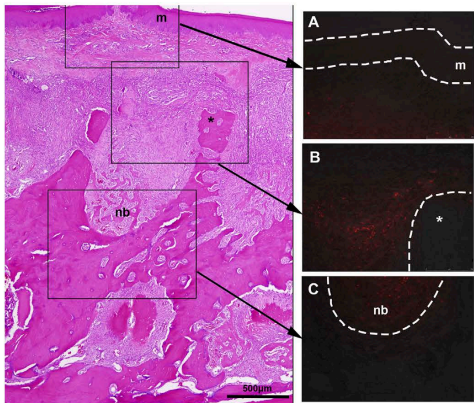
producing these proteins until their senescence (5–10 days). Therefore, the influence of PRP over bone healing, which is a slow process, seems to be concentrated exclusively at the beginning of the process, and other long-lasting treatments are thought to be more beneficial. This observation could explain why, in our model, PRP does not seem to add benefits (no significance) over the flap alone.

ASCs are MSCs obtained from adipose tissue (Zuk et al., 2001) and are capable of secreting a great variety of growth factors (Salgado et al., 2010) with a significant impact on tissue regeneration (Tsuji et al., 2014). Endothelial lineage cell recruitment by MSCs could potentially play an interesting role in improving the vascular supply (Chen et al., 2008). A significant number of MSCs grafted into the wound can result in the augmentation of the local blood supply and improvement of regeneration capacity (Cella et al., 2011), and subsequently could allow for better osteogenesis of the damaged bone (Gonzalez-Garcia et al., 2013). We found that animals treated with stem cells showed a lower rate of

osteonecrosis (14%; Table 2) and higher osteoclast density (Table 2) ( $p = 0.007$  and  $p = 0.045$ , respectively). Consequently, bone remodeling was increased in stem cell–treated specimens ( $p = 0.024$ ). Nevertheless, no significance was observed during vascularity analysis.

MSCs also have unique immunomodulatory properties (Nauta and Fibbe, 2007; Wolf and Wolf, 2008). This activity is thought to be largely based on inhibition of T-cell and B-cell proliferation and dendritic cell maturation (Nauta and Fibbe, 2007) and the secretion of a large number of cytokines and growth factors (Chen et al., 2008). MSCs also are able to restore the immunologic imbalance produced by zoledronic treatment (between T helper cells and regulatory T-cells), which may alter the inflammatory response of alveolar socket healing in ZA-treated animals (Kikui et al., 2010; Li et al., 2013). However, in our study, inflammatory infiltrates were detected in animals of all groups, with no close relation with osteonecrosis foci. No adverse reaction against allogeneic ASCs or PRP was observed. Although autologous PRP use is the most





**Fig. 3.** Fluorescence study in an animal from group 3. (A) Adipose-derived stem cells (ASCs) labeled with PKH-26 (red fluorescence) located at submucosa. (m, mucosa). (B) ASCs located within the whole alveolar socket. (\*crestal bone). (C) ASCs located within new bone trabeculae (nb).

common form of PRP used in humans, allogeneic PRP use in small animals makes it possible to obtain a large amount of this product from few donor animals (Rajabi et al., 2015).

ASCs have a great advantage over bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in terms of cell yield. Both types of MSCs seem to have similar properties. However, ASCs are characterized by faster cell proliferation, stable population doubling, and lower levels of senescence than BM-MSCs. Some papers describe inferior osteogenic but superior angiogenic capacity of ASCs over that of BM-MSCs (Liao and Chen, 2014). ASCs have been shown to survive in ischemic environments and to increase secretion of growth factors (VEGF, HGF, and bFGF) that are necessary for angiogenesis under hypoxic conditions (Rehman et al., 2004; Lee et al., 2009). This fact is interesting for treatment of bone osteonecrosis and ischemic wounds as in BRONJ.

Basic studies have found important and synergic effects between PRP and MSCs (Van Pham et al., 2013). Both PRP and MSCs stimulate macrophage recruitment and shorten the acute inflammatory response, which leads to early progress to chronic inflammation and tissue regeneration (Georgiev-Hristov et al., 2012). In our study, we used PRP clot for packing and retaining the ASCs transplanted in group 3, as PRP is an osteoconductive agent that provides stability and adhesion to ASCs. This combination

**Table 3**  
Radiologic findings of each treatment group.

Group	Osteosclerosis	Bone thickening	Cortical disruption
1	85%	23%	38%
2	100%	54%	18%
3	87%	47%	20%
4	92%	31%	8%

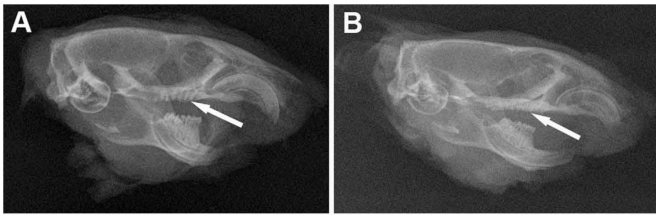
Percentage of osteonecrosis, bone thickening, and cortical disruption of each group of animals.

decreased BRONJ incidence compared to mucosal flap and increased bone turnover. The paradoxically high percentage of mucosal disruption observed in the histologic analysis in group 3 could be explained by mucosal slight dehiscence favored by the large volume of PRP-ASC clot, although PRP and submucosa continued covering the bone on the seventh day after the oral surgery. It was found that PRP seems to decrease VEGF secretion of ASCs in PRP-cultured cells (Van Pham et al., 2013). This fact could explain the difference in bone vascularization between groups 3 and 4. In group 4, ASCs cultured with BMP-2 were directly spread over alveolar sockets and covered with a PRP clot, which might have less direct influence over the ASCs.

In order to enhance the osteogenic capacities of the ASCs, we introduced BMP-2, as this protein has been reported to be an osteogenic enhancer (Cowan et al., 2005) and PRP has been described as an enhancer of osteoblastic differentiation in the presence of BMPs (Tomoyasu et al., 2007). With this combination, we achieved the lowest incidence of BRONJ. This group also had the highest osteoclast count and vascularity 1 week after dental extractions, but bone turnover or bone resorption was higher in the group with ASCs without BMP-2, although these findings were not statistically significant. Further preclinical and clinical studies are needed to elucidate all of the implications of PRP and BMP-2 in ASC bone regeneration.

We advocate local application of the MSCs (Cella et al., 2011) and not intravenous infusion (Kikui et al., 2010; Li et al., 2013). This application allows the benefits of ASCs to be concentrated in the area of interest. The fluorescence study revealed ASCs within the fibrous tissue and remodeled bone at the alveolar socket 7 days after their application, suggesting that ASCs are able to survive and disperse within the healing tissue in ZA-treated rats 1 week after dental extractions.

Murine models have the disadvantage of a rapid metabolism and better healing than in humans, providing results that may be difficult to extrapolate to humans. Small animal models are indicated for the initial study of new therapies because of their cost-effectiveness, easy handling, and fewer ethical and logistic issues, especially for long-lasting treatments, as in the case of BRONJ. No bone exposure was archived in our study; this situation was favored



**Fig. 4.** Plane radiographs of hemiheads 1 week after extractions. (A) Cortical disruption at alveolar ridge in an animal from group 1 (arrow). (B) Alveolar bone thickening in an animal from group 4 (arrow).

by the different treatments applied for BRONJ prevention and by the fact that no other drugs that may enhance osteonecrosis (e.g., corticoids or other immunosuppressive drugs) were administered, with the exception of ZA. Even with the limitations of this study, histologic osteonecrosis should be considered a relevant finding in animals with high metabolism and high bone turnover. Histologic osteonecrosis with no clinical bone exposure seems to be an initial phase of the disease, although histologic features are not included in the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) definition of BRONJ in humans. The preventive effect of ASCs shown in this study provides new data for further advancing research on potential treatments for this severe disease in humans.

## 5. Conclusion

Despite the limitations of this experimental study performed in a limited number of animals, the study exemplifies preventive treatment of BRONJ after dental extractions in rats. As no other drugs were applied, the BRONJ-like lesions in our study are totally bisphosphonate dependent, which allows us to reach conclusions on the role of the studied treatments. We found that ASC-based treatments seem to prevent BRONJ in this high-risk model, providing greater efficiency than mucosal flap with or without PRP. The combination of ASC and PRP appears to be synergistic, and the addition of BMP-2 could improve results even further. As all of these treatments are already in clinical use and as their safety profile has been widely studied, we believe that the combinations that we propose will soon be studied in clinical settings to determine their value in high-risk patients. Simultaneously, preclinical studies are needed to better describe the long-term results of these novel treatments and to obtain further details on the exact molecular mechanisms involved in the pathogenesis of BRONJ that could be prone to influence.

## Conflict of interest statement

All authors declare that they have no competing interests, with the exception of MGA. MGA is a co-author of 2 patents entitled "Identification and isolation of multipotent cells from non-osteochondral mesenchymal tissue" (10157355957US) and "Use of adipose tissue-derived stromal stem cells in treating fistula" (US11/167061). The Universidad Autónoma de Madrid (UAM) and Cellerix share the patent rights.

## Acknowledgements

We thank Carlota Largo, veterinarian in the Experimental Surgery Department, for logistical support and experimental animal care, and Luz Vega, technician in the Cell Therapy Laboratory of Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, for technical assistance. The authors also thank Oliver Shaw (IIS-FJD) for revising the text for aspects related to the English language.

This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (FIS PI10/01991) and a RETICS grant from ISCIII (RD12/0019/0035) and the Education Council of Madrid (P2010/BMD-2420).

## References

Abtahi J, Agholme F, Aspenberg P: Prevention of osteonecrosis of the jaw by mucoperiosteal coverage in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42: 632–636, 2013

Anavi-Lev K, Anavi Y, Chaushu G, Alon DM, Gal G, Kaplan I: Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: clinico-pathological investigation and histomorphometric analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 115: 660–666, 2013

Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burguero M: Zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaws. *Experimental model with dental extractions in rats*. *J Cranio-Maxillofac Surg* 42: 744–750, 2014

Basi DL, Hughes PJ, Thumbyger-Math V, Sabino MA, Mariash A, Lunos SA, et al: Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of zoledronic acid-treated rats. *J Oral Maxillofac Surg* 69: 2698–2707, 2011

Bocanegra-Pérez S, Vicente-Barrero M, Knezevic M, Castellano-Navarro JM, Rodríguez-Bocanegra E, Rodríguez-Millares J, et al: Use of platelet-rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41: 1410–1415, 2012

Cella L, Oppici A, Arbas MC, Moretto M, Piepoli M, Vallisa D, et al: Autologous bone marrow stem cell intrasession transplantation repairing bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. *Head Face Med* 7: 16, 2011

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y: Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3: e1886, 2008

Cowan CM, Aalami OO, Shi YY, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al: Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover. *Tissue Eng* 11: 645–658, 2005

Dodson TB: Intravenous bisphosphonate therapy and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 44–52, 2009

Georgiev-Hristov T, García-Arranz M, García-Gómez J, García-Cabezas MA, Trébol J, Vega-Clemente L, et al: Sutures enriched with adipose-derived stem cells decrease the local acute inflammation after tracheal anastomosis in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg* 42: e40–e47, 2012

González-García M, Rodríguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodríguez-González MA, Onate-Sánchez R, et al: Cell therapy in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg* 24: e226–228, 2013

Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al: Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 25: 1668–1679, 2010

Kuhl S, Walter C, Acham S, Pfeffer R, Lambrecht JT: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—a review. *Oral Oncol* 48: 938–947, 2012

Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, et al: Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen* 17: 540–547, 2009

Lee SH, Chan RC, Chang SS, Tan YL, Chang KH, Lee MC, et al: Use of bisphosphonates and the risk of osteonecrosis among cancer patients: a systematic review and meta-analysis of the observational studies. *Support Care Cancer* 22: 553–560, 2014

Li Y, Xu J, Mao L, Liu Y, Gao R, Zheng Z, et al: Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for bisphosphonate-related jaw osteonecrosis in swine. *Stem Cells Dev* 22: 2047–2056, 2013

Liao HT, Chen CT: Osteogenic potential: comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 6: 288–295, 2014

Longo F, Guida A, Aversa C, Pavone E, Di Costanzo G, Ramaglia L, et al: Platelet rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: personal experience and review of the literature. *Int J Dent* 298945, 2014

Martins MAT, Martins MD, Lascala CA, Curi MM, Migliorati CA, Tenis CA, et al: Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study. *Oral Oncol* 48: 79–84, 2012

Marx RE: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 1115–1117, 2003

Marx RE: Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 62: 489–496, 2004

Mathias Duarte LF, dos Reis HB, Tucci R, Dib LL: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: analysis of a case series at a dental school. *Spec Care Dentist* 34: 77–83, 2014

Mozzati M, Gallesio G, Arata V, Pol R, Scoletta M: Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a report of 32 cases. *Oral Oncol* 48: 469–474, 2012

Nauta AJ, Fibbe WE: Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110: 3499–3506, 2007

Pak J: Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain Physician* 15: 75–85, 2012

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al: Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147, 1999

Rajabi H, Sheikhan Shahin H, Norouzi M, Mehrabani D, Dehghani Nazhvan S: The healing effects of aquatic activities and allogeneic injection of platelet-rich plasma (PRP) on injuries of Achilles tendon in experimental rat. *World J Plast Surg* 4: 66–73, 2015

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Claus S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al: Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292–1298, 2004

Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 2–12, 2009

Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM: Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 5: 103–110, 2010



## CURRICULUM VITAE RESUMIDO

### Estudios de Grado:

- 2001-2007 Licenciatura en Medicina y Cirugía por la Universidad de Zaragoza
- 2007-2008 Tesina de Licenciatura: “Estudios Morfofuncionales con radioisótopos. De la Autorradiografía al PET”. Calificación: Sobresaliente.

### Estudios de Postrado:

- 2008-2009 Periodo de Docencia de estudios de Doctorado: Fundamentos Anatómicos de la actuación clínica. Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Calificación global: 9.85
- 2009-2010 Periodo investigador: Trabajo de Investigación en Cirugía General y Digestiva. Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid
- 2010 Diploma Estudios Avanzados, Doctorado de Cirugía : ***“Estudio de la relación causal entre el empleo de bisfosfonatos y el desarrollo de osteonecrosis en los maxilares tras exodoncias. Puesta a punto de un modelo experimental en ratas.”*** Calificación: 9
- 2010-2013 Integrante del equipo de investigador Proyecto FIS Expediente nº PI10/01991: **“Determinación de la relación**

**causal entre el empleo de bisfosfonatos y el desarrollo de osteonecrosis en los maxilares. Aplicación de células madre mesenquimales para su tratamiento sobre modelo experimental animal” ...”**

Especialización:

2008-2013      Cirugía Oral y Maxilofacial en Hospital Universitario La Paz  
(Madrid)

Estancias y Rotaciones:

2011 (Febrero-Marzo) **Az Sint-Jan**, Division of Maxillo-facial Surgery.  
Department of Surgery. Bruges, Belgium

2012 (Abril)                **Head and Neck Service at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center**, New York, USA.

2012 (Noviembre)        **Hospital Moinhos do Vento**. Servicio de Cirugía Plástica. Porto Alegre, Brasil

Miembro asociaciones médicas y científicas:

2008 - Actualidad Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial

2011 - 2013 International Association of Oral and Maxillofacial Surgery

2008 - Actualidad Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Madrid

2014 Revisora en la revista International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery



Actividades científicas y de formación (durante los estudios del Tercer Ciclo):

• **Publicaciones Científicas:**

- **“Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model”**\_\_\_\_J Craniomaxillofac Surg. 2015 Sep;43(7):1161-8. doi: 10.1016/j.jcms.2015.04.026. (Disponible online Mayo 2015).

Paula Barba-Recreo, JL Del Castillo Pardo de Vera, T Georgiev-Hristov, E Ruiz Bravo-Burguillos, A Abarrategi, M Burgueño, M García-Arranz.

- **“Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats”**. J Craniomaxillofac Surg. 2014 Sep;42(6):744-50 (Disponible online 15 Noviembre 2013).

Paula Barba-Recreo, JL Del Castillo Pardo de Vera, M García-Arranz, L Yébenes, M Burgueño.

- **“Schwannoma del nervio facial intraparotídeo. Un dilema terapéutico. Intraparotid facial nerve schwannoma. A therapeutic dilemma”**. Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial. Disponible online 13 Abril 2014.

Paula Barba-Recreo, J Arias Gallo, MJ Morán Soto, E Palacios Weiss, M Burgueño García.

- **“The role of surgical resection and platelet-rich therapies in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws”**. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery - October 2013 (Vol. 42, Issue 10, Page 1186, DOI: 10.1016/j.ijom.2013.07.065) J.L. Del Castillo Pardo De Vera, A. Viejo Llorente, D. Garcia Molina, P. Barba Recreo, E. Mirada Donisa, M. Burgueño Garcia

- **“Gorham disease in the craniofacial area. Therapeutical approach”** International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery - October 2013 (Vol. 42, Issue 10, Page 1171. E. Gomez, J.C. Lopez, M. Martín, P. Barba, M. Burgueno



- **“Quiste dermoide congénito en suelo de boca”**. Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial 2010;32(4):185-188

L Pingarrón Martín, E Gómez García, M Martín Pérez, P Barba Recreo, M Burgueño García.

• **Cursos:**

Asistencia a más de 47 cursos, seminarios y congresos, entre ellos a destacar:

- Curso AO CMF: Principios de Osteosíntesis. AO Foundation Education. 23 horas. 2009. (Valladolid)

- Células Madre para Terapia celular. Hospital Universitario La Paz. 3,6 créditos. 2009. (Madrid)

- Métodos estadísticos en un proyecto de investigación. Hospital Universitario La Paz. 30 horas. 2009 (Madrid)

- Curso práctico de Microcirugía experimental y colgajos microvasculares en la rata. Hospital Universitario La Paz. 6,5 créditos. 2010 (Madrid)

- Curso Intensivo de colgajos en Cirugía Reconstructiva disección en cadáver. 6,2 créditos. 2012 (Madrid)

- Curso de experimentación animal Categoría B. Hospital Ramón y Cajal. 6,4 créditos. 2012 (Madrid)

- Curso Multidisciplinario de Anomalías dentofaciales. Centro Ortomax. 15 créditos. 2013-2014 (Madrid)

- Curso Teórico-práctico de Base de Cráneo. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. 4,8 créditos. 2015 (Barcelona)

- Curso Experto Universitario en Implantología Oral por la Universidad de Burgos. SECOM. 2012-2014

- Curso de Protección Radiológica para Dirigir instalaciones de Rayos X con fines de diagnóstico médico (IRD). CSN. 25 horas. 2011. (Madrid)

- **Presentaciones Científicas y ponencias en Congresos:**

Autora (18) y co-autora (17) de presentaciones orales y póster en congresos nacionales e internacionales, entre ellos a destacar: “International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery” (ICOMS) y “Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery”.

Junio 2017